



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

# **Interacciones entre un microorganismo solubilizador de fósforo, una bacteria fijadora de nitrógeno y un hongo micorrizal sobre la nutrición y el crecimiento vegetal**

**Ángela Patricia Moreno Quevedo**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2015



# **Interacciones entre un microorganismo solubilizador de fósforo, una bacteria fijadora de nitrógeno y un hongo micorrizal sobre la nutrición y el crecimiento vegetal**

**Ángela Patricia Moreno Quevedo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Geomorfología y Suelos**

Director:

Ph.D., Nelson Walter Osorio Vega

Codirector:

M.Sc., Octavio Augusto González Murillo

Línea de Investigación:

Microorganismos solubilizadores de fósforo

Grupo de Investigación:

Microbiología del Suelo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2015



*A mi familia*



## **Agradecimientos**

Al Director de la tesis Nelson Walter Osorio Vega, por la buena disposición con que me recibió en todo momento. Sus sugerencias y aportes fueron fundamentales para sacar adelante este trabajo.

Al Codirector Octavio González Murillo, por su gestión en el desarrollo de esta investigación.

A Juan Esteban Posada Bermúdez y Ricardo Soto Micolta por su apoyo en la consecución de este nuevo logro en mi vida.

A Manuel Fernando Restrepo Llano por su compañía a lo largo de la Maestría.

A Catalina Echeverry Ríos por apoyarme durante la ejecución del proyecto.

Por ultimo un agradecimiento especial a mi familia por compartir este proceso que hoy finaliza.





## Resumen

El uso de fertilizantes de síntesis para la nutrición vegetal en la agricultura ha traído algunos problemas, entre los cuales se encuentra el aumento en los costos de producción y riesgos de contaminación de aguas superficiales. Por tanto, se requiere generar alternativas biotecnológicas viables que aumenten la eficiencia de la fertilización. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación individual o combinada con microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP), bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y hongos micorrizales (HM) sobre la nutrición y el crecimiento vegetal. Para esto, primero se evaluó la efectividad para disolver rocas fosfóricas (RP) aciduladas por parte de varios MSP. Los resultados indicaron que el más efectivo fue *Aspergillus niger*. En un segundo experimento, se evaluó el efecto interactivo de RP acidulada (RPA) o no acidulada (RPNA), *A. niger* y *Azospirillum* sp. sobre la nutrición y el crecimiento de plántulas de maíz y frijol micorrizadas. Los mejores resultados sobre las especies micorrizadas se mostraron con la aplicación de RPNA y *A. niger*. En contraste, la inoculación con *Azospirillum* sp. no mostró ningún efecto significativo sobre las variables respuesta. La RPA tampoco mostró diferencias significativas con respecto al control (no-fertilizado). En conclusión, la interacción de MSP y HM favoreció la nutrición y el crecimiento vegetal y dicho efecto estuvo condicionado a la fuente de RP empleada.

**Palabras clave:** Fósforo, Nitrógeno, Biofertilizantes, Efectividad.

## Abstract

The use of synthetic fertilizers for plant nutrition in agriculture has brought some problems, among which is the increase in production costs and risks of pollution of surface waters. Therefore, it is required to generate viable alternatives biotechnological that increase the efficiency of fertilization. The aim of this study was to evaluate the effect of individual or combined inoculation with phosphorus solubilizing microorganisms (PSM), mycorrhizal fungi (MF) and nitrogen fixing bacteria (NFB) on nutrition and plant growth. For this, we first evaluated the effectiveness to dissolve acidulated Rock phosphate (RP) by several PSM's. The results indicated that the most effective was *Aspergillus niger*. In a second experiment, the interactive effect of acidulated or not-acidulated RP, *A. niger* and *Azospirillum* sp. on nutrition and growth of mycorrhizal-maize and mycorrhizal-beans was evaluated. The best results on mycorrhizal species were with the application of not-acidulated RP and *A. niger*. In contrast, inoculation with *Azospirillum* sp. did not show any significant effect on the response variables. The acidulated RP also showed no significant differences with the control (not-fertilized). In conclusion, the interaction of PSM and MF favored nutrition and plant growth and this effect was conditioned RP source used.

**Keywords: Phosphorus, Nitrogen, Biofertilizers, Effectiveness.**

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción .....	1
<b>1. Capítulo 1: Marco teórico .....</b>	<b>5</b>
1.1 Fijación de N <sub>2</sub> .....	5
1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo .....	7
1.3 Simbiosis micorrizal.....	8
1.4 Bibliografía .....	10
<b>2. Capítulo 2: Disolución <i>in vitro</i> de rocas fosfóricas aciduladas por microorganismos solubilizadores de fósforo .....</b>	<b>23</b>
2.1 Resumen.....	23
2.2 Introducción.....	23
2.3 Materiales y métodos .....	24
2.4 Resultados .....	26
2.5 Discusión.....	32
2.6 Bibliografía .....	34
<b>3. Capítulo 3: Efecto de la inoculación con un hongo solubilizador de fósforo y una bacteria fijadora de nitrógeno sobre el desarrollo de plántulas maíz y frijol micorrizadas .....</b>	<b>39</b>
3.1 Resumen.....	39
3.2 Introducción.....	39
3.3 Materiales y métodos .....	41
3.3.1 Preparación del sustrato.....	41
3.3.2 Preparación del inóculo .....	42
3.3.3 Plantas hospederas.....	44
3.3.4 Tratamientos .....	44
3.3.5 Variables a medir .....	45
3.3.6 Diseño experimental y análisis de datos.....	46
3.4 Resultados .....	46
3.5 Discusión.....	69
3.6 Bibliografía .....	71

<b>A. Anexo: Valores de cada una de las variables respuesta para cada uno de los tratamientos – Disolución <i>in vitro</i> de RP por MSP .....</b>	<b>79</b>
<b>B. Anexo: Valores de cada una de las variables respuesta para cada uno de los tratamientos – Efecto de la inoculación con un HSP y una BFN sobre el desarrollo de plántulas maíz y frijol micorrizadas.....</b>	<b>81</b>
<b>C. Anexo: Fichas técnicas RP .....</b>	<b>87</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> pH del medio en función de la inoculación individual y combinada (As: <i>A. niger</i> , At: actinomiceto; B: <i>Bacillus</i> sp.; Pn: <i>Penicillium</i> sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). ....	27
<b>Figura 2-2:</b> Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de RP utilizada en el medio de cultivo, inoculado con MSP. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). ....	28
<b>Figura 2-3:</b> Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de inóculo utilizado. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). ....	29
<b>Figura 2-4:</b> Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de RP usada y la inoculación individual y combinada (As: <i>A. niger</i> , At: actinomiceto; B: <i>Bacillus</i> sp.; Pn: <i>Penicillium</i> sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con el asterisco (*) indican diferencia significativa entre las RP para la inoculación dada (mínima diferencia significativa de Fisher, $p \leq 0.05$ ). ....	29
<b>Figura 2-5:</b> Relación entre la concentración de P soluble y el pH del medio. La letras indican el tipo de microorganismo(s) empleado como inóculo (As: <i>A. niger</i> , At: actinomiceto; B: <i>Bacillus</i> sp.; Pn: <i>Penicillium</i> sp.). ....	30
<b>Figura 2-6:</b> Masa seca microbial (mg) en función del tipo de RP utilizada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). ....	31
<b>Figura 2-7:</b> Masa seca microbial (mg) en función de la inoculación individual y combinada (As: <i>A. niger</i> , At: actinomiceto; B: <i>Bacillus</i> sp.; Pn: <i>Penicillium</i> sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). ....	31

**Figura 3- 1:** Técnica del número más probable. ....43

**Figura 3- 2:** Altura (cm) de plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....47

**Figura 3- 3:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....48

**Figura 3- 4:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....48

**Figura 3- 5:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *Azospirillum* sp. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....49

**Figura 3- 6:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....49

**Figura 3- 7:** Presencia de *A. niger* (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....50

**Figura 3- 8:** Contenido P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) en plantas de maíz micorrizadas fertilizadas con RP: (a)  $0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; (b)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPNA; (c)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación. ....51

**Figura 3- 9:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 55 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ....52

**Figura 3- 10:** Concentración de P foliar (%) en plantas de maíz micorrizadas fertilizadas con RP: (a) 0 mg.kg<sup>-1</sup>; (b) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPNA; (c) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* a diferentes días después de germinación..... 53

**Figura 3- 11:** Concentración de P foliar (%) 25 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p<0.05$ ). ... 54

**Figura 3- 12:** Concentración de P foliar (%) al 40 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ )...... 54

**Figura 3- 13:** Contenido de P aéreo final (mg planta<sup>-1</sup>) en plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 55

**Figura 3- 14:** Contenido de P aéreo final (mg planta<sup>-1</sup>) en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 56

**Figura 3- 15:** Altura (cm) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 57

**Figura 3- 16:** Altura (cm) de plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 57

**Figura 3- 17:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 58

**Figura 3- 18:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ). ..... 59

**Figura 3- 19:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error

estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ). .....59

**Figura 3- 20:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *Azospirillum* sp. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). .....60

**Figura 3- 21:** Presencia de *A. niger* (%) en raíces de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). .....60

**Figura 3- 22:** Contenido P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas fertilizadas con RP: (a) 0  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; (b) 300  $\text{mg.kg}^{-1}$  RPNA; (c) 300  $\text{mg.kg}^{-1}$  RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación. ....62

**Figura 3- 23:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 40 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). .....63

**Figura 3- 24:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 55 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). .....63

**Figura 3- 25:** Concentración de P foliar (%) en plantas de frijol micorrizadas fertilizadas con RP: (a) 0  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; (b) 300  $\text{mg.kg}^{-1}$  RPNA; (c) 300  $\text{mg.kg}^{-1}$  RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación. ....65

**Figura 3- 26:** Concentración de P foliar (%) 25 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con asterisco (\*) indican diferencias significativas entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ). .....66

**Figura 3- 27:** Concentración de P foliar (%) al 40 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). .....66

**Figura 3- 28:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las



columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). ..... 67

**Figura 3- 29:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). ..... 68

**Figura 3- 30:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ). ... 68

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1:</b> Niveles de significancia del análisis de varianza. ....	26
<b>Tabla 3-1:</b> Niveles de significancia del análisis de varianza para maíz. ....	46
<b>Tabla 3-2:</b> Niveles de significancia del análisis de varianza para fríjol. ....	56

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
As	<i>Aspergillus niger</i>
As-	Ausencia <i>A. niger</i>
As+	Presencia <i>A. niger</i>
At	Actinomiceto
ATP	Adenosín trifosfato
Azo-	Ausencia <i>Azospirillum</i> sp.
Azo+	Presencia <i>Azospirillum</i> sp.
B	<i>Bacillus</i> sp.
BFN	Bacteria fijadora de nitrógeno
BSP	Bacteria solubilizadora de fósforo
CCI	Corporación Colombia Internacional
CONPES	Consejo Nacional de Política Económica y Social.
CPAF	Contenido de fósforo aéreo final
ddg	Días después de la germinación
EDRP	Efectividad de disolver la roca fosfórica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FENALCE	Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas
HATS	Sistema de transporte de alta afinidad
HM	Hongos micorrizales
HSP	Hongos solubilizadores de fósforo
MF	Mycorrhizal fungi
MSA	Masa seca aérea
MSP	Microorganismos solubilizadores de fósforo
N	Nitrógeno
NFB	Nitrogen fixing bacteria
NMP	Número más probable
P	Fósforo
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento
Pn	<i>Penicillium</i> sp.
PSM	Phosphorus solubilizing microorganisms
RP	Roca fosfórica
RPA	Roca fosfórica acidulada
RPNA	Roca fosfórica no-acidulada
UFC	Unidades formadoras de colonia



# Introducción

## Problema

La deficiencia de nitrógeno (N) y fósforo (P) en suelos tropicales se constituye en una limitante para la productividad vegetal (Roveda y Polo, 2007). Por lo anterior es necesaria la aplicación de dosis altas de fertilizantes solubles para alcanzar o mantener concentraciones adecuadas de estos en la solución del suelo (Narsian y Patel, 2000).

Uno de los riesgos de la agricultura intensiva es que parte de los fertilizantes aplicados presentan altos costos y la eficiencia obtenida es muy baja (Kennedy *et al.*, 2004; Franco y Dobereiner, 1994). Esto provoca la insostenibilidad de los sistemas tradicionales de agricultura intensiva. Además, de ocasionar riesgos ambientales serios [acumulación en cuerpos de aguas (Stewart y Howell, 2003); producción de gases de invernadero como  $N_2O$ ,  $NO$  y  $NH_3$  (Jackson *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2004)], lo que genera problemas, a largo plazo, de contaminación e impacto sobre la salud pública.

Ante esta situación, es fundamental generar alternativas biotecnológicas viables, sencillas y de fácil aplicación por los productores, que permitan la sostenibilidad agrícola y la preservación del medio ambiente.

Como modelo de esta problemática se tomaron dos especies vegetales de interés socio-económico: maíz y frijol. El primero se producen 1.600.000 t/año (2012) en un área de 504.706 ha (31% de la producción y 53% del área en sistema de cultivo tradicional con rendimiento promedio bajo -1.8 t/ha-, mientras que con el cultivo tecnificado el rendimiento fluctúa entre 4.5 y 11 t/ha) (FENALCE 2012, 2010). A nivel nacional los costos de producción del maíz son de \$4.017.190/ha, la fertilización representa 19.8% (\$796.157) (FENALCE, 2012). Principalmente se aplican fertilizantes nitrogenados y fosfóricos (100-150 kg N/ha, 100-150 kg/ha  $P_2O_5$ ) (Osorio, 2014).

Del segundo se producen 141.349 t/año (2012) en un área de 109.632 ha (cultivo perteneciente a la economía campesina de tipo minifundio, con bajas productividades debido al no uso de prácticas modernas de mecanización, ni altos niveles de tecnificación) (FENALCE 2012, 2010). A nivel nacional los costos de producción del frijol son de \$3.921.497/ha, la fertilización representa 13.2% (\$517.650) (CCI, 2009).

Principalmente se aplican fertilizantes nitrogenados y fosfóricos (75-100 kg N/ha, 100-150 kg/ha  $P_2O_5$ ) (Osorio, 2014).

Los fertilizantes nitrogenados y fosfóricos solubles en Colombia son importados, los precios internacionales son variables, en algunos años recientes (2007-2008) estos se han duplicado o triplicado, lo cual afecta la seguridad y soberanía alimentaria (Hylton, 2008).

### Justificación

Este trabajo hace un aporte a la producción sostenible y competitiva de maíz y frijol en Colombia, siendo el interés el sistema de cultivo tradicional en donde es necesario aumentar la productividad reduciendo los altos costos de producción, en donde los insumos, especialmente fertilizantes, tienen una buena participación.

En la actualidad, con los altos precios de los fertilizantes solubles se requiere urgentemente identificar alternativas sostenibles que mejoren el uso eficiente de N y P. Para ello, se pueden implementar estrategias que aumenten la eficiencia en su uso en ambientes de baja disponibilidad. Una posibilidad es el uso de la roca fosfórica (RP) que es localmente disponible (Huila, Norte de Santander y Boyacá), barata, pero de baja reactividad, baja disolución y, por ende, de lenta liberación de P (FAO, 2007). Sin embargo, ésta se mejora con algunos microorganismos capaces de disolverla y por tanto son llamados “microorganismos solubilizadores de P” (MSP) (Rajan *et al.*, 1996; Hammond *et al.*, 1986; Khasawneh *et al.*, 1979). Entre los MSP se tienen bacterias del género *Bacillus* (Chen *et al.*, 2006; Vásquez *et al.*, 2000) y hongos de los géneros *Penicillium* (Wakelin *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2001; Whitelaw, 2000) y *Aspergillus*. En este último sobresale *A. niger* en virtud de su capacidad para producir ácido cítrico (Tallapragada y Seshachala *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2002). Algunos autores reportan actinomicetos capaces de solubilizar RP (Hamdali *et al.*, 2012; Franco-Correa *et al.*, 2010; Chang y Yang, 2009; Mba, 1997, 1994).

Otra alternativa biológica consiste en usar hongos micorrizales (HM) que mejoran la absorción de P por las plantas y, de esta manera, estimula el crecimiento y la nutrición vegetal (Kramer y Green, 2000).

Según el INVAM existen más reportes sobre el empleo experimental de *Rhizophagus fasciculatus* (= *Glomus fasciculatum*) como organismo que con otras especies de hongos arbusculares (496 reportes) (<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/fasciculatum>). Este es un HM de gran

efectividad y versatilidad en condiciones de suelos, clima y en diferentes cultivos (Hernández y Salas, 2009). Además posee un amplio rango de tolerancia al pH, y preferencia a suelos ácidos (Rodríguez *et al.*, 2004; Hayman y Tavares, 1985).

La inoculación dual de HM y MSP se ha reportado como efectiva para aumentar la absorción de P por las plantas (Osorio, 2008; Antunes *et al.*, 2007).

Otra opción importante es el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y/o bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Barea *et al.*, 2002). Se conocen varias bacterias asociativas que fijan N<sub>2</sub>, con capacidad de producir fitohormonas como giberelinas y ácido indolacético (Muhammad y Frankenberger, 1991; De Freitas y Germida, 1989). Estas estimulan la germinación, el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales y favorecen la absorción de nutrientes (Bashan y Holguin, 1994). Las bacterias del género *Azospirillum* se han reportado como fijadoras de N<sub>2</sub> y promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). La contribución de la fijación biológica N por *Azospirillum* al crecimiento de la planta se considera que es generalmente menor a la esperada (Boddey y Dobereiner 1994; Okon 1985). La asociación maíz-*Azospirillum* ha demostrado un potencial económico alto debido a la afinidad que muestran entre sí (Rangel-Lucio, 2011; García de Salamone, 2009; De Bashan *et al.*, 2007). Por otro lado, varios autores han consignado los efectos positivos de la simbiosis frijol- *Azospirillum* para incrementar los niveles de N y P en la planta, o bien mediante la inducción en el aumento del desarrollo de pelos radicales (Burdman *et al.*, 1996; Itzigsohn *et al.*, 1995; Okon y Kapulnik, 1986). Aunque es claro que existen otros modelos de fijación biológica de N más efectivos para el frijol, como es la fijación simbiótica a través de *Rhizobium* (Lodwig y Poole 2003; Herouart *et al.*, 2002; Oke y Long, 1999), el uso de *Azospirillum* es atractivo para mejorar la absorción de otros nutrientes.

Hasta el momento se reportan estudios donde se ha determinado que hay efectos benéficos en el desarrollo de las plantas mediante la coinoculación con BFN y MSP (Parvaze *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2006; Rudresh *et al.*, 2005); MSP y HM (Souchie *et al.*, 2006; Osorio, 2003; Satpal y Kapoor, 1998); también sobre el uso combinado de HM y BFN (Matías *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2007; Antunes *et al.*, 2006). Sin embargo, hay pocos registros del efecto de la triple inoculación entre HM, MSP y BFN sobre el desarrollo y la nutrición vegetal (Scotti *et al.*, 2009; Caravaca *et al.*, 2006). Igualmente, con este trabajo se puede evaluar el potencial que tienen las RP colombianas para ser

usadas en la nutrición vegetal, al ser mejoradas a través de procesos biotecnológicos, siendo esta una alternativa sostenible importante.

En este contexto se planteó la presente investigación con el objeto de evaluar la interacción entre *Aspergillus niger* y *Azospirillum* sp. sobre la nutrición y el crecimiento de plántulas de maíz y frijol micorrizadas, y los posibles efectos interactivos con fuentes fosfóricas locales (RP).

Además, esta propuesta es coherente con las políticas estatales del CONPES 3577, en la cual se busca fomentar la productividad en el sector agrícola, con miras a promover el uso de biofertilizantes y abonos orgánicos en el país y generar alternativas de sustitución de los fertilizantes inorgánicos.

### **Hipótesis**

La inoculación de MSP, BFN y HM puede favorecer la nutrición y el crecimiento vegetal. Su efecto puede ser mayor si se combinan sus actividades, ya que se esperan que tengan funciones complementarias que favorezcan la nutrición vegetal. El efecto interactivo de estos microorganismos está condicionado a la fuente de RP empleada.

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la inoculación individual o combinada con MSP, BFN y HM sobre la nutrición y el crecimiento vegetal.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la inoculación individual o combinada de MSP sobre la disolución de RP aciduladas.
- Evaluar el efecto interactivo de MSP, BFN y HM sobre el desarrollo vegetal.



# 1. Capítulo 1: Marco teórico

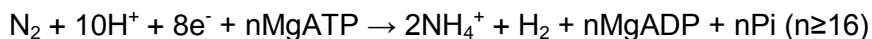
## 1.1 Fijación de N<sub>2</sub>

La productividad y dinámica de los ecosistemas terrestres está limitada a la disponibilidad de los nutrientes. Para las plantas la disponibilidad de nitrógeno (N) es el principal limitante en la productividad de los cultivos (Dawe *et al.*, 2000). Para incrementar la disponibilidad de este nutriente y mejorar la productividad de los cultivos, se introducen al suelo fertilizantes químicos; aunque, su utilización es crítica para la producción de alimentos, hoy en día se ha convertido en una práctica costosa y que acarrea serias consecuencias ambientales (Fiedls, 2004). El desarrollo de prácticas de manejo racionales y eficientes, que incrementen y/o mantengan la fertilidad, a través del uso óptimo de los nutrientes, requiere conocimiento acerca de los mecanismos responsables de la dinámica de dicho elemento (Cerón y Aristizábal, 2012).

Diferentes formas de vida participan en los procesos que se llevan a cabo en el suelo; pero, las comunidades microbianas poseen un papel principal, ya que de ellas dependen funciones como hacer disponibles los nutrientes para ellas mismas y para otras formas de vida como las plantas, dinámica esencial para el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos (Madsen, 2011).

El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el N hasta una forma utilizable es conocido como fijación biológica de N (FBN). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y permite no sólo usar el N atmosférico, sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Mayz-Figueroa, 2004; Parsons, 2004).

La FBN es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bajo la reacción general:



Esta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H<sub>2</sub> producido por mol de N<sub>2</sub> reducido

(Halbleib y Luden, 2000). La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno; del tal manera que, los organismos fijadores poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Lee *et al.*, 2004; Ureta y Nordlund, 2002).

Los microorganismos en vida libre son capaces de fijar el N sin tener que realizar una simbiosis con una planta en especial; proporcionan al medio, es decir, a la rizósfera compuestos nitrogenados para que este sea aprovechado por las plantas. Al ser microorganismos independientes a la planta para fijar el N, deben generar su propia energía para realizar esta actividad (Paredes, 2013).

Entre los principales géneros bacterianos que se hallan en vida libre o endófitos asociados a la rizósfera se encuentran: *Azotobacter* spp., *Azotococcus* spp., *Azospirillum* spp., *Beijerinckia* spp., *Azotomona* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Chromatium* spp., *Chlorobium* spp., *Desulfovibrio* spp., *Desulfomona* spp., *Gluconacetobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Klebsiella* spp. (Rodríguez *et al.*, 2003; Allan y Graham, 2002). Se estima que estos microorganismos fijan anualmente entre 140 y 175 millones de toneladas de N, cantidad que es casi dos veces la producción mundial de fertilizantes nitrogenados (De Felipe Antón, 2004; Burity *et al.*, 1989).

La utilización de dichos microorganismos para proveer N a través de la fijación biológica, ha adquirido gran relevancia en los últimos tiempos, ya que se estaría ante una tecnología alternativa a la fertilización química. Esto permitiría llevar a cabo una agricultura más sostenible, debido a que bacterias colonizadoras de raíces posibilitarían incrementar la eficiencia de absorción de N aplicado, y por tanto, reducir sus pérdidas por lixiviación, volatilización y erosión. Adicionalmente, la presencia de estos microorganismos benéficos asociados a cultivos de interés agrícola acelera procesos bioquímicos que influyen en el crecimiento de los mismos (Obando *et al.*, 2010).

Por muchos años se consideró que el efecto benéfico de las bacterias fijadoras de N (BFN) sólo provenía de la utilización por las plantas del amonio excretado; así, existen numerosas publicaciones que prueban tal efecto (Becker *et al.*, 2002; Mirza *et al.*, 2001); sin embargo, se ha encontrado que estas bacterias también producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas) que afectan, favorablemente, el desarrollo de las plantas, particularmente de la raíz (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Más recientemente, se ha reportado que las BFN incrementan la capacidad radical de absorción de nitrato, indirectamente como una consecuencia de la estimulación del desarrollo radical y

directamente por estimulación del sistema transportador del compuesto (Mantelin y Touraine, 2004).

## 1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo

El fósforo (P) es uno de los elementos más importantes en la nutrición vegetal; ya que, cumple con funciones vitales en el metabolismo vegetal y es uno de los nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Atlas y Bartha, 2001). Desafortunadamente, la mayoría de los suelos presentan concentraciones bajas de P disponible que, con frecuencia, limitan la productividad vegetal. Esto es particularmente cierto en los suelos altamente meteorizados de los trópicos (Oxisoles y Ultisoles) y en los derivados de cenizas volcánicas (Andisoles) (Buol *et al.*, 1997; Sánchez y Uehara, 1980).

La baja disponibilidad de este elemento se debe a reacciones que remueven iones fosfato disponible desde la solución del suelo hasta la fase sólida del mismo. Dicho fenómeno es ampliamente conocido como fijación de P. Existen dos tipos de reacciones (Collavino *et al.*, 2010; Havlin *et al.*, 1999): (i) la adsorción de iones fosfato sobre la superficie de los minerales arcillosos del suelo y (ii) la precipitación de fosfato con cationes de la solución del suelo. Con la formación de estos compuestos tan insolubles se disminuye la disponibilidad de P para las plantas (Wakelin *et al.*, 2004).

Una de las estrategias para incrementar la disponibilidad de P en suelos ácidos tropicales con alta capacidad fijadora de P, consiste en aplicar altas dosis (500-1000 mg kg<sup>-1</sup> de suelo) de fertilizantes fosfóricos solubles (superfosfato triple), pero una gran parte del P es fijado (90-95%) y es liberado a través del tiempo, generando así un efecto residual. La proporción del P tomado por la planta con respecto al P aplicado en el cultivo es considerablemente baja (5-10%) (Osorio, 2003; Sánchez y Uehara, 1980). Sin embargo, debido al alto costo de los fertilizantes, estas altas tasas de fertilización fosfórica no son aplicadas por la mayoría de los agricultores (Engelstad y Terman, 1980).

Por consiguiente, resulta indispensable la búsqueda de fuentes alternativas de insumos fosfóricos. En este contexto, bajo ciertas condiciones de suelo y de clima, la aplicación directa de las rocas fosfóricas (RP) es una alternativa agronómica y económicamente correcta (Sale y Mokwunye, 1993; Chien *et al.*, 1990; Chien y Hammond, 1978). Estas son más económicas, pero de baja reactividad dada su lenta disolución y liberación de P (Hamdali *et al.*, 2010; Yusdar *et al.*, 2007). En este contexto se han desarrollado varias

investigaciones para mejorar la efectividad agronómica de la RP en los suelos cultivados. Una alternativa es inocular la RP con microorganismos solubilizadores de P (MSP), los cuales pueden mejorar su disolución, incrementando así su disponibilidad para las plantas (Khan *et al.*, 2007; Whitelaw, 2000; Kucey *et al.*, 1989).

Los MSP son una alternativa promisorio a implementar en zonas tropicales; ya que, debido a su capacidad de solubilizar los fosfatos insolubles del suelo, reversan los procesos de fijación de P (Rao, 1992).

Hay muchos MSP en el suelo como bacterias del tipo *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus* (Kim *et al.*, 1998; Barea *et al.*, 1975) y hongos como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mortierella* (Osorio y Habte, 2013; Zhang *et al.*, 2011; Bojinova, 2008; Morales *et al.*, 2007; Osorio, 2003; Reyes *et al.*, 2001; Whitelaw, 2000). Aunque las bacterias han recibido mayor atención, varios autores (Osorio y Habte, 2009; Kucey, 1983; Arora y Gaur, 1979) han indicado que los hongos pueden ser más efectivos solubilizando P. Además, después de varios subcultivos las bacterias solubilizadoras de P (BSP) pueden perder su capacidad solubilizante, mientras que los subcultivos de hongos solubilizadores de P (HSP) pueden mantener tal capacidad (Rashid *et al.*, 2004; Whitelaw, 2000). Así mismo, las hifas de los hongos pueden crecer en contacto con la superficie de la RP, solubilizándola como resultado de sus actividades metabólicas (Bermanec *et al.*, 2012). Por otro lado, debido a la biomasa de los hongos Alam *et al.* (2002) indican que los hongos pueden inmovilizar más P que las bacterias.

Varios mecanismos se han propuesto para explicar la solubilización microbial de compuestos inorgánicos de P. La producción de ácidos orgánicos (Bar-Yosef *et al.*, 1999; Cunningham y Kuiack, 1992), la liberación de protones a la solución del suelo (Whitelaw, 2000; Reyes *et al.*, 1999; De Freitas *et al.*, 1997), la desorción de iones P de los sitios de adsorción (Osorio y Habte, 2012; Osorio, 2008; He y Zhu, 1998 y 1997) y la quelatación de Ca, Al y Fe (Marschner, 2008; Richardson *et al.* 2001; Ryan *et al.*, 2001; Bar-Yosef *et al.*, 1999; Iyamuremye *et al.*, 1996).

### 1.3 Simbiosis micorrizal

Los hongos micorrizales (HM) son microorganismos del suelos que forman simbiosis con el 95% de las especies vegetales (Vierheilig, 2004; Giovanetti y Sbrana, 1998). Estos son biótrofos obligados, es decir, que no pueden ser cultivados y multiplicados en ausencia de una planta hospedera. La razón más aceptada es que el hongo durante la

larga evolución de la relación simbiótica, perdió su capacidad para fijar carbono o la maquinaria genética para hacerlo, y llegó a ser completamente dependiente de una planta hospedera para obtener fotoasimilados (Gadkar *et al.*, 2001). Pertenecen al Phylum Glomeromycota, Orden Glomales, el cual consiste de cinco familias y siete géneros reconocidos por las características de sus esporas (Morton, 2009; Dugan, 2006). Los HM son uno de los siete tipos de micorriza que se conocen (Peterson *et al.*, 2004). Esta asociación simbiótica actúa como un complemento de la raíz de la planta en la toma de nutrientes (Colozzi-Filho y Cardoso, 2000), especialmente en la absorción de P (Requena, 2007), aumento de la tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico, mejoramiento de la calidad del suelo, fijación de N<sub>2</sub> (Barea *et al.*, 2005) y aumento en la diversidad y productividad de las plantas en un ecosistema determinado (Van der Heijden *et al.*, 1998; Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

Desde el punto de vista nutricional, el crecimiento de la planta debido al aumento en la absorción de P es el principal beneficio que obtiene del HM, por la baja disponibilidad de este elemento, característico en los suelos tropicales. Sin embargo, si el P no es un elemento limitante en el suelo, la simbiosis puede llegar a ser reducida o hasta inhibida si se encuentran altos niveles en el suelo (Zandavalli *et al.*, 2004; Blanco y Salas, 1997).

La eficiencia de los HM para la captación de iones fosfato se debe al incremento en el área de suelo explorada por las hifas extrarradicales, y a la existencia de proteínas transportadoras de P de alta afinidad (HATS), las cuales se expresan tanto en las hifas extrarradicales como en las membranas periarbusculares. Estas proteínas se expresan a bajas concentraciones de P en la solución del suelo permitiendo la captación eficiente de iones fosfato (Smith *et al.*, 2003). Las hifas externas de los HM se extienden 10 a 12 cm desde la superficie de la raíz, captando a su paso los nutrientes de lenta difusión (P, Cu, Zn). Ello supera la zona de captación de P por parte de la raíz, la cual es de solo 1 a 2 mm. Se ha reportado que por cada cm de raíz colonizada hay en promedio 1 m de hifas micorrizales; incluso, se han reportado valores de 10 a 14 m de hifas por cada cm de raíz colonizada (Johansson *et al.*, 2004). Las hifas de los HM tienen un diámetro 2.5 a 5 veces menor que el de las raíces de las plantas y una mayor área de superficie por unidad de volumen. Ello hace que el hongo sea mucho más eficiente que las raíces en la captación de P, y permite explorar los espacios del suelo que no son accesibles a algunas raíces.

Independientemente de su papel nutricional, la colonización por HM favorece el establecimiento de interacciones con otros microorganismos benéficos. La hifa micorrizal

también libera compuestos carbonáceos a su alrededor y forma un nicho llamado “micorrizosfera”. Usualmente, los beneficios de los microorganismos de la rizósfera son incrementados en presencia de la simbiosis micorrizal (Osorio, 2011; Salamanca, 1998).

## 1.4 Bibliografía

- [1] ALAM S., KHALIL S., AYUB N., RASHID M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2002; 04(4):454-458.
- [2] ALLAN D., GRAHAM P. Soil 5611: Soil Biology and Fertility: Simbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis. Dep. of Soil, Water, and Climate. University of Minnesota. 2002.
- [3] ANTUNES P. M., SCHNEIDER K., HILLIS D., KLIRONOMOS J. N. Can the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* actively mobilize P from rock phosphates? *Pedobiologia*, 2007; 51(4):281-286.
- [4] ANTUNES P.M; DEAVILLE D; GOSS M.J. Effects of two AMF life strategies on the tripartite symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* and soybean. *Mycorrhiza*. 2006; 16:167-173.
- [5] ARORA D; GAUR A.C. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1979; 17:1258-1261.
- [6] ATLAS R.; BARTHA R. Ecología microbiana y ambiental. Quinta edición. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., pp. 559-610. 2001.
- [7] AZCÓN R., BAREA J.M. Mycorrhizal dependency of a representative plant species in mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecol*. 1997; 7:83-92.
- [8] BAREA J. M., AZCON R., HAYMAN D. S. Possible synergistic interactions between Endogene and phosphate solubilizing bacteria in low phosphate soils. In *Endomycorrhizas*. Eds. F E Sanders, B Mosse and P B Tinker. pp 409-418. Academic Press, London, New York. 1975.
- [9] BAREA J. M., POZO M. J., AZCÓN R., AZCÓN-AGUILAR C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 2005; 56(417):1761-1778.
- [10] BAREA J.M., AZCON R., AZCON-AGUILAR C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002; 81, 343–351.2

- [11] BARROSO CB, PEREIRA GT, NAHAS E. Solubilization of  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$  by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon a nitrogen source. Braz J Microbiol. 2006. 37:434–438
- [12] BAR-YOSEF B., ROGERS R. D., WOLFRAM J. H., RICHMAN E. *Pseudomonas cepacia* mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. Soil Sci Soc Am J 1999; 63:1703-1708.
- [13] BASHAN Y., HOLGUIN G. Root to root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology. 1994, 60, 2120-2131.
- [14] BECKER D., STANKE R., FENDRIK I., FROMMER W. B., VANDERLEYDEN J., KAISER W. M., HEDRICH R. Expression of the  $\text{NH}_4^+$  transporter gene *LEAMT1;2* is induced in tomato roots upon association with  $\text{N}_2$ -fixing bacteria. Planta 2002; 215:424-429.
- [15] BERMANEC V., POSILOVIC H., GOBAC Z. Z., HRENOVIC J., MIKAC N., KNIEWALD G. Mineralogical and geomicrobiological investigation of phosphorite from Ervenik, Croatia. Geologia Croatica. 2012; 55(1):67-75.
- [16] BLANCO F., SALAS E. Micorrizas en agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. Agronomía Costarricense. 1997; 21(1):55-67.
- [17] BODDEY RM, DOBEREINER J. Biological nitrogen fixation associated with graminaceous plants. In Y Okon (ed), *Azospirillum* I Plant Associations. 1994. Florida: CRC Press. pp 119-135
- [18] BOJINOVA D., VELKOVA R., IVANOVA R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 2008; 99:7348–7353.
- [19] BUOL SW; HOLE FD; McCRAKEN RJ, SOUTHARD RJ. Soil Genesis and Classification. 4ª. Ed. Iowa State University Press. 1997. Iowa U. S. A. 527 p.
- [20] BURDMAN S., VOLPIN H.; KAPULNIK Y., OKON Y. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) root inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. Applied Environmental Microbiology. 1996; 62:3030-3033
- [21] BURITY HA., FARIS MA., CULMAN BE. Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. Plant and Soil. 1989;114-249-255.
- [22] CARAVACA F., KOHLER J., CARRASCO L., ROLDÁN A. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. Applied Soil Ecology. 2007; 35: 480-487.

- [23] CERÓN LE, ARISTIZÁBAL FA. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología. 2012; 14(1)
- [24] CHANG C.H, YANG S.S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multifunctional biofertilizer preparation. Bioresource Technology. 2009; 100: 1648-1658.
- [25] CHEN YP; REKHA PD; ARUN AB; SHEN FT; LAI W; YOUNG CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology. 2006; 34:33-41.
- [26] CHIEN S. H., SALE P. W. G., HAMMOND L. L. Comparison of the effectiveness of phosphorus fertilizer products. In: Phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania. Int. Rice Res. Inst., Manila, Philippines, pp. 143-156. 1990.
- [27] CHIEN S.H., HAMMOND L. A. Comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. Soil Sci. Soc. Am. J. 1978; 42:935-939.
- [28] COLLAVINO M., SANSBERRO P., MROGINSKI L., AGUILAR M. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biol Fertil Soils. 2010; 46:727-738
- [29] COLOZZI FILHO A, CARDOSO E. Detecção de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Raízes de Cafeeiro e de Crotolária Cultivada na Entrelinha. Pesq Agrop Bras. 2000; 35(10):2033-2042.
- [30] CONSEJO NACIONAL DE POLÍTICA ECONÓMICA Y SOCIAL. Documento CONPES 3577. Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. 33p. 2009.
- [31] CUNNINGHAM J., KUIACK C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Appl. Environ. Microbiol. 1992; 58: 1451-1458.
- [32] DAWE D., DOBERMANN A., MOYA P., ABDULRACHMAN S., SINGH B., LAL P., LI S.Y., LIN B., PANAULLAH G., SARIAM O., SINGH Y., SWARUP A., TAN P.S., ZHEN Q. X. How widespread are yield declines in long-term rice experiments in Asia? Field Crops Res. 2000; 66:175-193.
- [33] DE BASHAN LE., HOLGUIN G., GLICK BR., BASHAN Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.). Microbiología agrícola: hongos, bacteria, micro y macrofauna, Control biológico, Planta-microorganismo. 2007. Trillas, México. pp 177-224



- [34] DE FELIPE ANTON MA. Interacciones microorganismos-suelo-plantas en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. An. R. Acad. Nac. Farm. 2004; 70(3): 743-776.
- [35] DE FREITAS G., GERMIDA J. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. Applied and Environmental Microbiology. 1989; 64: 362-368.
- [36] DE-FREITAS J.R., BANERJEE M.R., GERMIDA J.J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhances the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus*). Biol Fertil Soils. 1997; 24:358-364.
- [37] DUGAN P., DEY M.M., SUGUNAN V.V. Fisheries and water productivity in tropical river basins: enhancing food security and livelihoods by managing water for fish. Agri. Wat. Mgt. 2006; 80:262-275.
- [38] ENGELSTAD O., TERMAN G. Agronomic effectiveness of phosphate fertilizer. In: Khasawneh. F., Sample. E., Kamprath. E. (eds). The role of the phosphorus in agriculture. Soil Science Society. Madison. WI. pp 311-332. 1980.
- [39] FAO, 2007. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible, Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal No. 13. Roma.
- [40] FENALCE. Importancia de los cultivos representados por FENALCE. El cerealista. Mayo – Junio 2010.
- [41] FENALCE. Indicadores cerealistas 2012.
- [42] FIEDLS S. Global Nitrogen: Cycling out of Control. Environmental Health Perspectives. 2004; 112: A556 -A563.
- [43] FRANCO A., DOBEREINER J. A biología do solo e sustentabilidade dos solos tropicais. Summa Phytopathologica. 1994; 20:68-74.
- [44] FRANCO-CORREA M; QUINTANA A; DUQUE C; SUAREZ C; RODRIGUEZ MX; BAREA JM. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Appl. Soil Ecol. 2010.
- [45] GADKAR V., DAVID-SCHWARTZ R., KUNIK T., KAPULNIK Y. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. Plant Physiology, 2001; 127:1493-1499.
- [46] GALINDO T., POLLANIA J., SANCHEZ J., MORENO N, VANEGAS J., HOGUIN G. Efecto de inoculantes microbianos sobre la promoción de crecimiento de plántulas de Mangle y plantas de *Citrullus vulgaris*, San Andrés Isla, Colombia. Acta Biológica Colombiana, 2006; 11(1):83-97.

- [47] GARCÍA DE SALAMONE, IE. Ecophysiology of the response to *Azospirillum* inoculation of cereal crops in Argentina. Progress in the use of PGPR. 8th. International PGPR Workshop. May 17-22, 2009. Portland, Oregon, USA. p. 48.
- [48] GIOVANNETTI M., SBRANA C. Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. Mycorrhiza. 1998; 8:123-130.
- [49] HALBLEIB C. M., LUDDEN P. W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. J. Nutr. 2000; 130:1081-1084.
- [50] HAMDALI H, MOURSALOU K, TCHANGBEDJI G, OUHDOUCH Y, MOHAMED H. Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. Afr. J. Biotechnol. 2012; 11(2):312-320.
- [51] HAMDALI H., SMIRNOV A., ESNAULT C., OUHDOUCH Y., VIROLLE M. J. Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. Appl Soil Ecol. 2010; 44:24-31.
- [52] HAMMOND L. L., CHIEN S. H., MOKWUNYE A. U. Agronomic Value of Unacidulated and Partially Acidulated Phosphate Rocks Indigenous to the Tropics. Advances in Agronomy 1986; 40:89-140.
- [53] HAVLIN J., BEATON J., TISDALE S. L., NELSON W. Soil fertility and fertilizer. An introduction nutrient management. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey. 1999.
- [54] HAYMAN DS., TAVARES M. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. New Phytologist. 1985; 100: 367-377.
- [55] HE Z. L., ZHU J. Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charge minerals. Soil Biology and Biochemistry 1998; 30:917-923.
- [56] HE Z. L., ZHU J. Transformation and bioavailability of specifically sorbed phosphate on variable-charge mineral soils. Biology and Fertility of Soils. 1997; 25:175-181.
- [57] HERNÁNDEZ W., SALAS E. La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. Agronomía Costarricense. 2009;33:17-30
- [58] HEROUART D, BAUDOUIN E, FREND P, HARRISON J, SANTOS R, JAMET A, VAN DE SYPE G, TOUATI D, PUPPO A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–Rhizobium symbiosis? Plant Physiology and Biochemistry. 2002;40: 619–624.

- [59] HYLTON K. Visión global del mercado de fertilizantes. 2008. pp. 7-18. En: Jiménez, F. (ed.) Actualización en fertilización de cultivos y uso de fertilizantes. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Bogotá 236 p.
- [60] ITZIGSOHN R., ABBASS Z., SARIG S., OKON Y. Inoculation effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. NATO ASI Ser. Ser. G. 1995;37: 503-513.
- [61] IYAMUREMYE F., DICK R. P., BAHAM J. Organic amendments and phosphorus dynamics. I. Phosphorus chemistry and sorption. Soil Sci. 1996; 161: 426-435.
- [62] JACKSON, ROBERT B. et. al; "Protecting climate with forests," Environmental Research Letters. 2008: 3, 044006, doi:10.1088/1748-9326/3/4/044006.
- [63] JOHANSSON J. F., PAUL L. R., FINLAY R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiol. Ecol. 2004; 48:1-13.
- [64] KENNEDY I.; CHOUDHURY A.; KECSKE'S M. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology & Biochemistry. 2004;36, 1229-1244.
- [65] KHAN M. S., ZAIDI A., WANI P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. Agron. Sustain. Dev. 2007; 27: 29-43
- [66] KHASAWNEH F. E., DOLL E. C. The use of phosphate rock for direct application to soils. Advances in Agronomy 1979; 30:159-206.
- [67] KIM K. Y., JORDAN D., MCDONALD. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biology and Fertility of Soils. 1998; 26:79-87.
- [68] KRAMER S., GREEN DM. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. Soil Biol Biochem. 2000. 32:179-188.
- [69] KUCEY R. M. N. Phosphate-solubilising bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soil. Can. J. Soil Sci. 1983; 63:671-678.
- [70] KUCEY R. M. N., JANZEN H. H., LEGETT M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in Agronomy. 1989; 42:198-228.
- [71] LEE S., FLORES-ENCARNACIÓN M., CONTRERAS-ZENTELLA M., GARCIA-FLORES L., ESCAMILLA J. E., KENNEDY C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. J. Bacteriol. 2004; 186(16):5384-5391.

- [72] LODWIG E, POOLE P. Metabolism of rhizobium bacteroids. Crit. Rev. Plant Sci. 2003; 22, 37–78.
- [73] MADSEN E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. Current opinion in biotechnology. 2011; 22(3):456-464.
- [74] MANTELIN S., TOURAINE B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. J Exp Bot 2004; 55:27-34
- [75] MARSCHNER P. The role of rhizosphere microorganisms in relation to P uptake by plants. En: The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. pp: 165-176. P.J. White y J.P. Hammond (Eds.) © Springer Science. 296 p. 2008.
- [76] MATIAS S. R., PAGANO M. C., MUZZI F. C., OLIVEIRA C. A., CARNEIRO A. A., HORTA S. H., SCOTTI M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. European Journal of Soil Biology. 2009.
- [77] MAYZ-FIGUEROA J. Fijación biológica de nitrógeno. UDO Agrícola 2004; 4(1):1-20.
- [78] MBA C. Field studies on two rock phosphate solubilizing actinomycete isolates as biofertilizer sources. Environ. Manage. 1994;18:263-269.
- [79] MBA C. Rock phosphate solubilizing *Streptosporangium* isolates from casts of tropical earthworms. Soil Biol. Biochem. 1997; 29:381-385.
- [80] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. Sistema de Información de Precios de los Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria. 2009.
- [81] MIRZA M. S., AHMAD W., LATIF F., HAURAT J., BALLY R., NORMAND P., MALIK K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. Plant Soil 2001; 237:47-54.
- [82] MORALES A., ALVEAR M., VALENZUELA E., RUBIO R., BORIE F. Effect of inoculation with *Penicillium albidum*, a phosphate-solubilizing fungus, on the growth of *Trifolium pratense* cropped in a volcanic soil. Journal of Basic Microbiology 2007; 47:275-280.
- [83] MORTON J. B. Reconciliation of Conflicting Phenotypic and rRNA Gene Phylogenies of Fungi in Glomeromycota Based on Underlying Patterns and Processes. En: Mycorrhizas – Functional Processes and Ecological Impact. Pp: 137-154. Concepción Azcón-Aguilar, José Miguel Barea., Silvio Gianinazzi., Vivienne Gianinazzi-Pearson (Eds). Springer. 244 p. 2009.

- [84] MUHAMMAD A, FRANKENBERGER JR. Microbial production of plant hormones. In: The rhizosphere and plant growth, Kluwer Academic Publisher. Norwell. 1991: 327-334.
- [85] NARSIAN V., PATEL H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. Soil Biology and Biochemistry. 2000; 32: 559-565.
- [86] OBANDO M, BURGOS L, RIVERA D, GARRIDO M, BALDANI VL, BONILLA R. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar. Acta Biol Colomb. 2010;15(3):105-120.
- [87] OKE V, LONG SR. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. Curr Opin Microbiol. 1999; 2: 641-646
- [88] OKON Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol. 3: 223-228.
- [89] OKON Y., KAPULNIK Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. Plant Soil. 1986; 90: 3-16.
- [90] OKON Y., LABANDERA-GONZÁLEZ C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 1994; 26: 1591-1601.
- [91] OSORIO N. W. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de P de tres suelos de Hawai. Tesis de maestría. Universidad de Hawaii, Honolulu. USA. 2003.
- [92] OSORIO N. W., HABTE M. Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. Biol Fertil Soils. 2013; 49:481-486.
- [93] OSORIO N. W., HABTE M. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and grow of plants in the soils of the tropics. En: Microbial Strategies for Crop Improvement. 2009: 325-351.
- [94] OSORIO N.W. Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms 392 p. 2008.
- [95] OSORIO N.W. Manejo de nutrientes en suelos del trópico. Segunda edición ISBN:978-958-44-9746-8. 2014, 416 p.
- [96] OSORIO N.W. Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos del trópico Colombia, Suelos Ecuatoriales ISSN: 0562-5351, 2011; 14 (1): 74 - 91

- [97] OSORIO NW, HABTE M. Effect of Nitrogen Form on the Effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. J Biofertil Biopestici. 2012; 3:1-4.
- [98] PAREDES MC. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. 2013.
- [99] PARSONS R. Plant - Microbe Metabolism. 2004. Disponible en: [www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm](http://www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm). (Última visita 24 de julio de 2014)
- [100] PARVAZE A. W, SAGHIR K. M; ALMAS Z. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. Journal of plant nutrition and soils science. 2007; 170(2):283-287.
- [101] PERSELLO-CARTIEAUX F., NUSSAUME L., ROBAGLIA C. Tales from the underground: molecular plant–rhizobia interactions. Plant Cell Environ. 2003; 26:189-199.
- [102] PETERSON R. L., MASSICOTE H., MELVILLE L. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. Ottawa: NRC Research press. 2004.
- [103] RAJAN S. S. S., WATKINSON J. H., SINCLAIR A. G. Phosphate rocks for direct application to soils. Advances in Agronomy. 1996; 57:77-159.
- [104] RANGEL-LUCIO J. A., RODRÍGUEZ-MENDOZA M. D., FERRERA-CERRATO L. N., CASTELLANOS-RAMOS R., RAMÍREZ-GAMA J. Z., ALVARADO-BÁRCENAS, E. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. Agronomía Mesoamericana. 2011; 22(2): 269-279.
- [105] RAO S. Biofertilizers in Agriculture. Editorial. A. A. Balkema, Rotterdam. 208 p. 1992.
- [106] RASHID M., KHALIL S., AYUB N., ALAM S., LATIF F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. Pak. J. Biol. Sci. 2004; 7:187-196.
- [107] REQUENA N., SERRANO E., OCÓN A., BREUNINGER M. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhizal establishment, Phytochemistry 2007; 68:33-40
- [108] REYES I., BAZIRAMAKENGA R., BERNIER L., ANTOUN H. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild type strain and two UV induced mutants of *Penicillium regulosum*. Soil Biol Biochem. 2001; 33:1741-1747

- [109] REYES I., BERNIER L., SIMARD R. R., ANTOUN H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol Ecol. 1999; 28:281-290
- [110] RICHARDSON A. E, HADOBAS P. A, HAYES J. E, O'HARA C. P, SIMPSON R. J. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. Plant Soil. 2001; 229:47-56.
- [111] RODRIGUEZ D., URREGO L., MARTINEZ P., BERNAL J. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aislado de bosque alto andino cundinamarqués Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. P 28. 2003.
- [112] RODRÍGUEZ Y. *et al.* Estudio comparativo de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicum esculentum* M. var "Amalia". Ecología Aplicada, l. 2004. 3(1y2): 162-171.
- [113] ROVEDA G., POLO C. Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Glomus* spp. en suelos con bajo fósforo disponible. Agron. colomb. [online]. 2007, 25(2): 349.
- [114] ROY S., KHASA D. P., GREER C. W. Combining alder, Frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. Canadian Journal Bot. 2007; 85:237-251.
- [115] RUDRESH D. L., SHIVAPRAKASH M. K., PRASAD R. D. Effects of combined application of Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and *Trichoderma* ssp. On growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied Soil Ecology, 2005; 28:139-146.
- [116] RYAN P. R., DELHAIZE E., JONES D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Ann Rev Plant Physiol. 2001; 52:527-560.
- [117] SALAMANCA E. F., KANEKO N., KATAGIRI S. Effects of leaf litter mixtures on the decomposition of *Quercus serrata* and *Pinus densiflora* using field and laboratory microcosm methods. Ecol. Eng. 1998; 10:53-73.
- [118] SALE P. W. G., MOKWUNYE A. U. Use of phosphate rocks in the tropics. Fert Res. 1993; 35:33-45.
- [119] SÁNCHEZ P., UEHARA G. Management considerations for acid soils with high phosphorus fixation capacity. En: KHASAWNEH, F. E., ed. The role of phosphorus in agriculture. En: Soil Science Society of America. 1980; p. 471-514.

- [120] SATPAL S., KAPOOR K. K. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza*. 1998; 7:249-253
- [121] SCOTTI M.R., MATIAS S.R., PAGANO M.C., MUZZI F.C., OLIVEIRA C.A., CARNEIRO A.A., HORTA S.N. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *European Journal of Soil Biology*. 2009; 45 259–266
- [122] SMITH K. A., BALL T., CONEN F., DOBBIE K. E., MASSHEDER J., REY A. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*. 2003; 54:779-791.
- [123] SOUCHIE E. L.; AZCON R.; BAREA M. J.; SAGGIN-JUNIOR O. J.; RIBEIRO da SILVA E. M. Phosphate solubilization and Synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa agropec brasileira*. 2006; 41(9):1405-1411.
- [124] STEWART B. A., HOWELL T. A. *Encyclopedia of water science*. Marcel Dekker (Ed). New York, U.S.A. 1076. 2003.
- [125] TALLAPRAGADA P., SESHACHALA U. Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of *Piper betel* in Karnataka, India. *Turk J Biol*. 2012; 36: 25- 35.
- [126] URETA A., NORDLUND S. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of bacteriology* 2002; 184(20):5805-5809
- [127] VAN DER HEIJDEN M. G. A., KLIRONOMOS J. N., URSIC M., MOUTOGLIS P., STREITWOLF-ENGEL R., BOLLER T., WIEMKEN A., SANDERS I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 1998; 396:69-72.
- [128] VASQUEZ P., HOLGUIN G., PUENTE M., LOPEZ A., BASHAN Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*. 2000; 30: 460-468.
- [129] VIERHEILIG H. Regulatory mechanisms during the plant - arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Can. J. Bot*. 2004; 82:1166-1176.
- [130] WAKELIN A., WARREN R., HARVEY P., RYDER P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol Fertil Soils* 2004; 40: 36-43.



- 
- [131] WHITELOW M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 2000; 69:99-151.
- [132] YUSDAR H., ANUAR A. R., HANAFI M. M., AZIFAH H. Analysis of phosphate rock dissolution determining factors using principal component analysis in some acid Indonesian soils. *Commun Soil Sci Plant Anal* 2007; 38:273-282.
- [133] ZANDEVALLI R. B., DILLENBURG L. R., PAULO V. D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Agric. Ecosyst. Environ. Applied Soil Ecol.*, 2004; 25: 245-255.
- [134] ZHANG H., WU X., LI G., QIN P. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya*. 2011.



## 2. Capítulo 2: Disolución *in vitro* de rocas fosfóricas aciduladas por microorganismos solubilizadores de fósforo

### 2.1 Resumen

La baja disponibilidad de fósforo (P) en el suelo y el costo de la fertilización fosfórica son limitantes para la productividad agrícola. Una alternativa biotecnológica para manejar este problema es mediante el uso de microorganismos del suelo capaces de disolver rocas fosfóricas (RP) y así mejorar su efectividad como fertilizante fosfórico. Con este fin se realizó un ensayo para determinar la efectividad microbial en la disolución *in vitro* de dos RP (Norte de Santander y Boyacá), parcialmente aciduladas. Los tratamientos consistieron en un arreglo factorial 2x16 [2 niveles de RP: Boyacá o Norte de Santander; 16 niveles de inóculo: Un control no inoculado, inóculos individuales (*Aspergillus niger* –As–, *Penicillium* sp. –Pn–, *Bacillus* sp. –B–, y un actinomiceto no identificado –At–), inóculos dobles (AsPn, AsB, AsAt, PnB, PnAt, BAt), inóculos triples (AsPnB, AsPnAt, AsBAt, PnBAt), e inóculos cuádruples (AsPnBAt)]. Cada tratamiento tuvo tres réplicas. La efectividad en la disolución *in vitro* de RP fue dependiente del tipo de RP, tipo de inóculo y la interacción de ambos factores, teniendo mejores resultados con la RP del Norte de Santander y *A. niger* sólo. Cuando este hongo se combinó con otros microorganismos su capacidad para disolver RP se redujo significativamente.

**Palabras claves:** *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., fosfato, biofertilizante

### 2.2 Introducción

La deficiencia de fósforo (P) en suelos tropicales se constituye en una limitante para la productividad vegetal (Cramer, 2010; Oberson A *et al.*, 2006). Por lo anterior, es necesario aplicar dosis altas de fertilizantes solubles para así alcanzar concentraciones adecuadas de éste en la solución del suelo (Vassilev *et al.*, 2012; Narsian y Patel, 2000).

Uno de los riesgos de la agricultura intensiva es que los fertilizantes aplicados presentan altos costos y la eficiencia obtenida es muy baja (Paiva-Coutinho *et al.*, 2012; Vassilev y Vassileva, 2003). Esto provoca la insostenibilidad de los sistemas tradicionales de agricultura intensiva.

Debido a esto se requiere, urgentemente, identificar alternativas sostenibles que mejoren el uso eficiente del P por las plantas cultivadas (Consensus Statement Declaration, 2011). La RP es una alternativa localmente disponible, barata, pero de baja reactividad dada su lenta disolución y liberación de P (Hamdali *et al.*, 2010; Yusdar *et al.*, 2007). Por otro lado, se sabe que la disolución de la RP se mejora cuando se incluyen en el sistema microorganismos capaces de disolverla, tal es el caso de los microorganismos solubilizadores de P (MSP) (Paiva-Coutinho *et al.*, 2012; Sahu y Jana, 2000; Whitelaw, 2000). Existen varios reportes en la literatura especializada sobre la disolución de RP por inóculos individuales (de una sola especie), pero poco se sabe acerca de la efectividad de consorcios microbiales (Saber *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008; Achal *et al.*, 2007; Ahuja *et al.*, 2007; Vassilev *et al.*, 2007; Vyas *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2002). Igualmente, las investigaciones se hacen con un tipo particular de RP, lo cual limita los resultados a efectos muy puntuales (Osorio y Habte, 2012; Xuan Yu *et al.*, 2012; Singh y Reddy, 2011). Así mismo, tradicionalmente se ha trabajado con RP no-aciduladas; aunque, en el mercado de los fertilizantes existen RP aciduladas que quizá se podría mejorar aún más su solubilidad con la inoculación con MSP (Osorno, 2013; Londoño, 2010).

La hipótesis en esta investigación es que la efectividad microbial para disolver RP parcialmente acidulada *in vitro* depende de varios factores tales como el tipo de RP, la combinación de microorganismos solubilizadores inoculados y la interacción entre ambos factores. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la efectividad microbial en la disolución *in vitro* de dos RP (Norte de Santander y Boyacá) parcialmente aciduladas al inocular de forma individual y combinada los microorganismos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. y un actinomiceto desconocido.

## 2.3 Materiales y métodos

Los MSP (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. y un actinomiceto desconocido) utilizados en este trabajo, se obtuvieron de la colección general del laboratorio de la empresa Sobiotech S.A.S. *A. niger* fue originalmente aislado de un suelo de la Altillanura-

Meta cultivado con maíz y soya. El hongo *Penicillium* sp. fue aislado de un suelo de Guarne-Antioquia cultivado con flores. *Bacillus* sp. fue aislada de un suelo de Santuario-Antioquia cultivado con frijol y lechuga. El actinomiceto fue aislado de un suelo de Planeta Rica-Córdoba cultivado con acacia. Dichos suelos con características ácidas.

Para este estudio los microorganismos se multiplicaron, separadamente, durante tres días a 28°C en cajas de Petri con el medio YMA (composición g L<sup>-1</sup>: extracto de levadura 4, extracto de malta 10, glucosa 4, agar 20), autoclavado (120°C, 0.1 MPa, 15 min). Las colonias fueron retiradas de la superficie del agar con un asa estéril y suspendidos en agua desionizada estéril, las suspensiones fueron ajustados al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland, y conservados en nevera a 4°C, para su posterior uso.

*Bacillus* sp. y el actinomiceto fueron cuantificados por Unidades Formadoras de Colonia (UFC mL<sup>-1</sup>), por el método de diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa por el método de microgota (Doyle M *et al.*, 2001). En el caso del *A. niger* y *Penicillium* sp., se cosecharon las esporas a partir del cultivo, utilizando 10 mL de solución de Tween 80 al 0.1%. Se realizó el recuento en una cámara Neubauer hasta obtener la concentración final conocida.

Estas suspensiones fueron utilizadas como inóculo. Las concentraciones utilizadas fueron: 7.64 Log 10 UFC mL<sup>-1</sup> (*Bacillus* sp. y actinomiceto) y 10<sup>5</sup> esporas mL<sup>-1</sup> (*A. niger* y *Penicillium* sp.).

Luego, 1 mL de cada suspensión fue transferida asépticamente a un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad que contenía 75 mL del medio selectivo, previamente esterilizado en autoclave (120°C, 0.1 MPa, 15 min), con la siguiente composición (por L): glucosa 10 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g, NaCl 1 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g y RP 3.5 g. (Osorio, 2008; Osorio y Habte, 2001). Las RP empleadas hacían parte de las minas explotadas comercialmente en el país; específicamente, en los departamentos de Norte de Santander y Boyacá. Dichas rocas fueron parcialmente aciduladas previamente con ácido sulfúrico concentrado (Hammond *et al.*, 1980); luego, fueron pasadas por un tamiz de 500 µm y retenidas en un tamiz de 250 µm. El contenido de P de las RP fue de 11 y 8.8%, respectivamente; y al preparar una suspensión acuosa al 10%, la concentración de P soluble fue de 2.31 y 1.91 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los Erlenmeyers se incubaron a 28°C en un agitador orbital a 100 rpm durante siete días.

Después del periodo de incubación, 50 mL de la suspensión fue centrifugada a 3220 xg durante 15 min. El sobrenadante se filtró a través de un papel filtro No. 42. El pH en la solución fue medido directamente con un electrodo selectivo de H<sup>+</sup>. La concentración de

P en la solución fue determinada usando el método azul-molibdato (Murphy y Riley, 1962). Con los datos de P soluble obtenidos se calculó el factor de efectividad para disolver RP (EDRP), el cual consiste en dividir la concentración de P soluble por la cantidad de P total en la RP y expresarlo en porcentaje [EDRP (%)= (P soluble/P en la RP) x 100].

La biomasa de los microorganismos inoculados fue colectada por centrifugación, lavada con agua destilada y secada al horno 70°C por 12 h. El crecimiento microbiano fue expresado como materia seca microbial producido por Erlenmeyer y se determinó como pérdida de peso después de la incineración a 500°C durante cinco horas. Este método se eligió para evitar la sobreestimación de pesos debido a la adherencia de los microorganismos a la RP (Reyes *et al.*, 1999).

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2x16 [2 niveles de RP: Boyacá o Norte de Santander; 16 niveles de inóculo: Un control no inoculado, inóculos individuales (*Aspergillus niger* –As-, *Penicillium* sp. –Pn-, *Bacillus* sp. –B-, y un actinomiceto no identificado –At-), inóculos dobles (AsPn, AsB, AsAt, PnB, PnAt, BAt), inóculos triples (AsPnB, AsPnAt, AsBAt, PnBAt), e inóculos cuádruples (AsPnBAt)]. Cada tratamiento tuvo tres réplicas.

Los datos obtenidos fueron estadísticamente analizados usando análisis de varianza y la prueba de rango múltiple de Duncan para determinar la separación de medias. El nivel de significancia (*p*) fue ≤ 0.05. Para todos los casos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (StatPoint, Inc., Herdon, Virginia, EE.UU.).

## 2.4 Resultados

La efectividad microbial para la disolución de RP, parcialmente acidulada *in vitro*, se vio afectada por los tratamientos (Tabla 2-1).

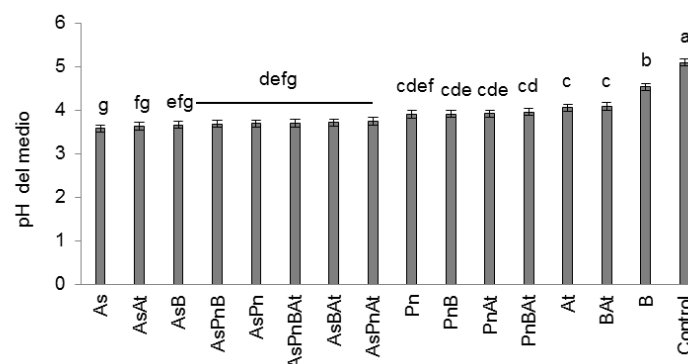
**Tabla 2-1:** Niveles de significancia del análisis de varianza.

Fuente de Variación	pH medio	P soluble	Masa seca microbial
A: RP	N.S.	0.0001	<0.0001
B: MICROORGANISMO	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AXB	N.S.	<0.0001	N.S.

N.S.: No significativo

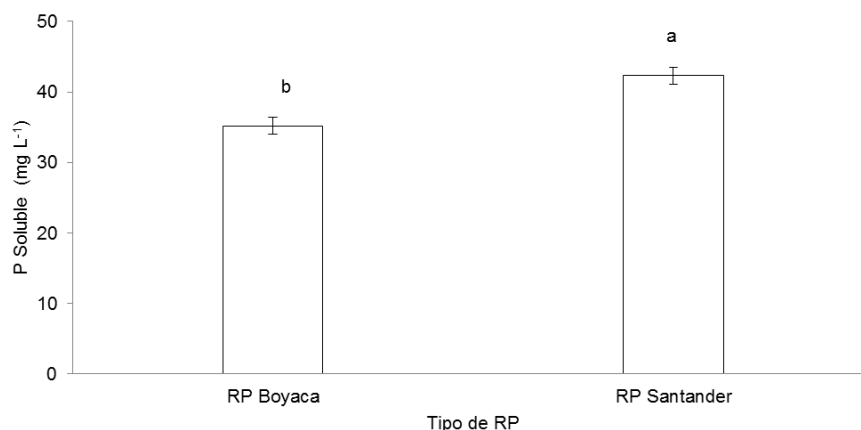
El pH del medio fue reducido significativamente ( $p < 0.05$ ) por la inoculación individual y combinada (As: *A. niger*, At: actinomiceto; B: *Bacillus* sp.; Pn: *Penicillium* sp.) (Figura 2-1). Así, el tratamiento control (no-inoculado) tuvo un pH 5.1, el cual fue significativamente superior al resto de tratamientos con inoculación. Se obtuvieron valores de pH significativamente más bajos cuando se inoculó con As sólo (3.6) o combinado con otros microorganismos (3.6-3.7). La inoculación con *Bacillus* sp. (B) presentó el valor de pH más alto (4.5) entre los tratamientos inoculados. Por otro lado, no se presentaron efectos significativos en el pH del medio en función del tipo de RP y la interacción RPxmicroorganismo.

**Figura 2-1:** pH del medio en función de la inoculación individual y combinada (As: *A. niger*, At: actinomiceto; B: *Bacillus* sp.; Pn: *Penicillium* sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).



La concentración de P soluble fue afectada, significativamente, por los tratamientos (RP, microorganismo, interacción) (Tabla 2-1). La concentración de P fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) cuando se utilizó la RP de Norte de Santander (P: 42.3 mg L<sup>-1</sup>) que con la RP de Boyacá (P: 35.2 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 2-2) independiente del efecto de la inoculación de microorganismos.

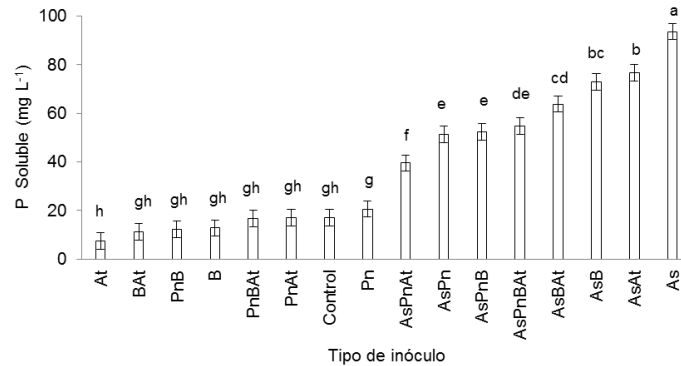
**Figura 2-2:** Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de RP utilizada en el medio de cultivo, inoculado con MSP. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).



La concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) del tratamiento control (no-inoculado) fue de  $17 \text{ mg L}^{-1}$ ; al inocular con *A. niger* sólo (As), esta aumentó significativamente a  $93.5 \text{ mg L}^{-1}$ , lo cual representa un incremento de 5.5 veces, siendo este el valor más alto detectado para esta variable (Figura 2-3). La inoculación con As, en combinación con los otros microorganismos, presentó valores de P soluble que fluctuaron entre  $39.5$  y  $76.5 \text{ mg L}^{-1}$  (diferencias significativas se presentaron entre estos); las cuales fueron significativamente mayores al control, pero inferiores a la inoculación con As sólo. La inoculación con los otros microorganismos no presentaron diferencias significativas al control (no-inoculado) (Pn:  $20.7 \text{ mg L}^{-1}$ , B:  $12.8 \text{ mg L}^{-1}$ , At:  $7.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las inoculaciones combinadas de estos últimos microorganismos tampoco difirieron del control.

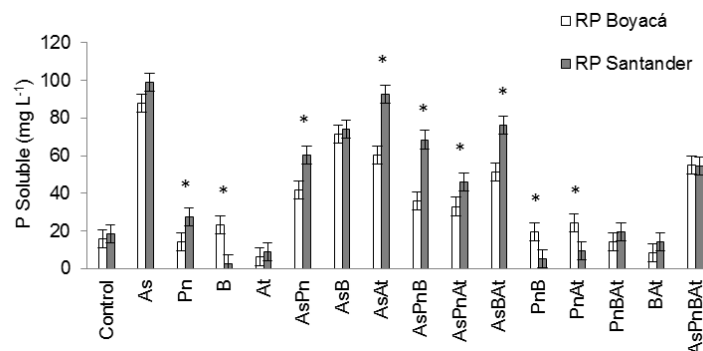


**Figura 2-3:** Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de inóculo utilizado. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



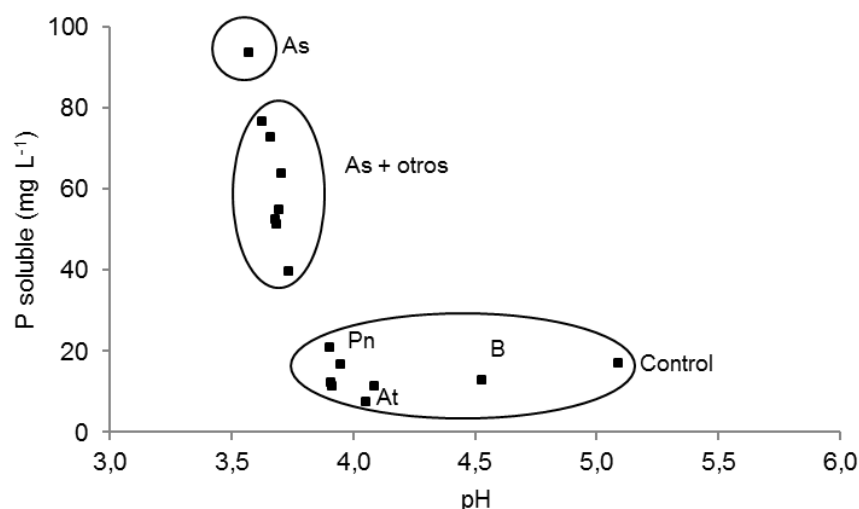
En cuanto a la interacción de los factores tipo de RP y microorganismo(s) inoculados, la concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ), presentó diferencias significativas para algunos de los casos. Por ejemplo, con la RP de Boyacá el mejor comportamiento se presentó con las inoculaciones B, PnB, PnAt. Para la RP del Norte de Santander, el mejor comportamiento se presentó en: Pn, AsPn, AsAt, AsPnB, AsPnAt, AsBAt. Con el resto de los microorganismos inoculados no hubo diferencias significativas con el tipo de RP utilizada (Figura 2-4.).

**Figura 2-4:** Concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tipo de RP usada y la inoculación individual y combinada (As: *A. niger*, At: actinomiceto; B: *Bacillus* sp.; Pn: *Penicillium* sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con el asterisco (\*) indican diferencia significativa entre las RP para la inoculación dada (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p \leq 0.05$ ).



Al comparar las variables concentración de P soluble y pH del medio, correspondiente a cada tipo de microorganismo(s) usado como inóculo; fue notable que, hubo una relación inversa entre las variables. Es decir, a menor pH hubo una mayor concentración de P soluble. Cuando el medio se inoculó sólo con As se presentó el pH más bajo y la concentración más alta de P soluble. Este fue seguido por el grupo de tratamientos que incluyen la inoculación de As con los otros microorganismos. La inoculación con los microorganismos Pn, B, At y sus combinaciones, no mostraron diferencias con el control en cuanto a la concentración de P soluble a pesar de la disminución del pH (~4.0) (Figura 2-5).

**Figura 2-5:** Relación entre la concentración de P soluble y el pH del medio. La letras indican el tipo de microorganismo(s) empleado como inóculo (As: *A. niger*, At: actinomiceto; B: *Bacillus* sp.; Pn: *Penicillium* sp.).

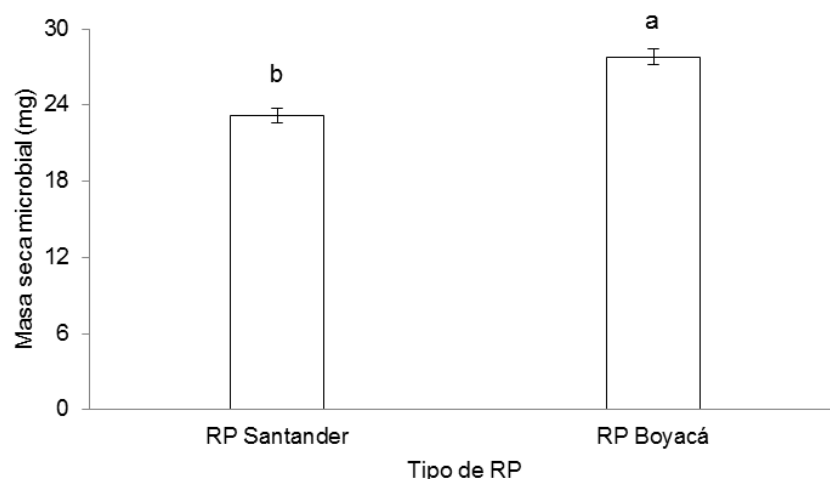


Por otro lado, la masa seca microbial (mg) fue significativamente diferente según el tipo de RP empleada, siendo mayor con la RP de Boyacá (27.8 mg) que con la RP Norte de Santander (23.2 mg); independiente del tipo de microorganismo inoculado (Figura 2-6).

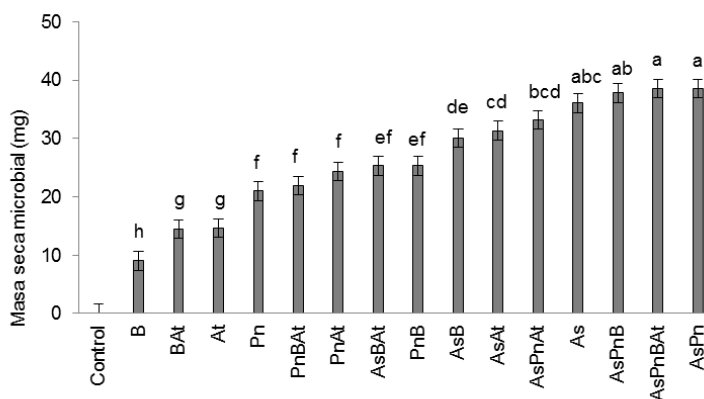
Igualmente, la masa seca microbial fue afectada por el tipo de microorganismo inoculado al medio. Al considerar la masa seca de los inóculos individuales se encontró el siguiente orden: As 36.1 mg > Pn 21.0 mg > At 14.7 mg > B 9.0 mg. En general, se detectó mayor masa seca microbial en los tratamientos que incluían la inoculación con As en forma combinada (25.3–38.3 mg) y menores con las combinaciones de los otros tratamientos

(Figura 2-7). Los resultados estadísticos indican que no hubo efectos significativos sobre la variable masa seca microbial en función a la interacción RPxmicroorganismo (Tabla 2-1).

**Figura 2-6:** Masa seca microbial (mg) en función del tipo de RP utilizada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 2-7:** Masa seca microbial (mg) en función de la inoculación individual y combinada (As: *A. niger*, At: actinomiceto; B: *Bacillus* sp.; Pn: *Penicillium* sp.). Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).



## 2.5 Discusión

Los resultados obtenidos permitieron demostrar, claramente, la hipótesis de que la efectividad microbiana para disolver RP parcialmente acidulada depende del inóculo microbiano utilizado, del tipo de RP y de la interacción entre ambos factores. La disolución de RP por microorganismos a través de la acidificación está bien documentada (Ben Farhat *et al.*, 2009; Gyaneshwar *et al.*, 1999; Illmer y Schinner, 1992). Dicha acidificación se debe a la extrusión de protones asociada con la asimilación de amonio (Sharan *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 1999; De Freitas *et al.*, 1997; Illmer *et al.*, 1995) o por la producción de ácidos orgánicos (Kang *et al.*, 2008; Pradhan y Sukla, 2005; Alam *et al.*, 2002; Cunningham y Kuiack, 1992). Evidencia de estos mecanismos en el presente trabajo queda reflejada en la disminución del pH desde un valor inicial de 5.1 a 3.6 con *A. niger*. En el caso de este hongo, existen autores que mencionan la producción de ácidos orgánicos, particularmente ácido cítrico, oxálico y glucónico, como su mecanismo de disolución (Seshadri *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 1999; Illmer y Schinner, 1995; Sperber, 1958).

Mittal *et al.* (2008), Barroso y Nahas (2005), Reddy *et al.* (2002) y Narsian y Patel (2000) reportaron que, la eficiencia relativa en la disolución de RP depende del tipo de RP y del microorganismo utilizado; además, de la cantidad y la calidad del ácido secretado al medio. En los resultados de Chuang *et al.* (2007) para *A. niger* cuando usaban Ca-P como fuente de P se detectaba ácido glucónico, al utilizar Fe-P o Al-P se detectaba ácido oxálico. Por su parte, Bojinova *et al.* (2008) y Goenadi *et al.* (2000) detectaron ácido cítrico principalmente, entre otros ácidos.

Al considerar la EDRP de los inóculos individuales se encontró el siguiente orden entre los microorganismos evaluados: As 21.9% > Pn 4.8% > B 3.0% > At 1.8%. En el control (no-inoculado) la EDRP fue de 4.0%. Por lo tanto, vale la pena resaltar la alta efectividad de *A. niger* para disolver RP. Estos resultados corroboran lo obtenido por Mittal *et al.* (2008) y Achal *et al.* (2007) en los cuales *Aspergillus* spp. aumentó el P soluble a partir de la disolución de fosfato tricálcico y RP (4.7 y 248 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Del mismo modo, Saber *et al.* (2009) demostraron que la máxima disolución *in vitro* de RP se obtuvo con *A. niger* (67 mg L<sup>-1</sup>) seguido por *Penicillium* spp. (46.2 mg L<sup>-1</sup>). En contraste, Jayasinghearachchi y Seneviratne (2006) encontraron que la disolución de RP por *Penicillium* spp., fue significativamente mayor que la de *Aspergillus* spp.

Por otro lado, Yadav y Tarafdar (2003) y Reyes *et al.* (1999) registraron una correlación negativa entre la masa seca microbial y la concentración de P soluble obtenido de la disolución de RP. Ello, está de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que la RP con mayor disolución (RP Norte de Santander) generó menor masa seca microbial que la hallada con la otra RP de Boyacá. Estos autores sugieren la presencia de un mecanismo de bomba de  $H^+$  implicado en la disolución de pequeñas cantidades de RP, lo que permite un mayor desarrollo de la biomasa. Ellos también sugieren que los aislamientos con baja biomasa pueden trasladar el carbono para producir una mayor cantidad y diversidad de ácidos orgánicos que disuelven más RP, lo que conlleva a un drenaje de C y esto explicaría la menor biomasa (Mathews *et al.*, 2000).

Es claro que, al combinar un microorganismo eficiente en la disolución de RP como *A. niger* con otros microorganismos menos eficientes o ineficientes (Pn, B y At), se redujo significativamente la capacidad para disolver RP con respecto a su efecto individual. Quizá la menor concentración de P soluble se debe a (i) competencia por la fuente de C (glucosa) y otros nutrientes (p.e., Ca, Mg, Fe, etc.) y/o (ii) que los otros microorganismos estén consumiendo el P liberado previamente por *A. niger*. Independiente de cuál es la razón, es evidente que al dejar menos P soluble, tales co-inoculaciones resultan desfavorables si se considera su eventual uso en presencia de plantas cultivadas; en ese caso es preferible usar individualmente aquel microorganismo que resulte más eficiente. Este aspecto puede ser investigado en el futuro con detalle para probar esta apreciación. Un aspecto muy relevante del presente estudio es que se usaron RP aciduladas. Los controles no inoculados presentaron valores de P soluble de  $17 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en otros trabajos con el mismo método los valores son de  $\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ . La acidulación de P se ha propuesto como una forma de mejorar la efectividad de la RP como fertilizante (FAO, 2007). Los resultados sugieren que los microorganismos solubilizadores de RP pueden acelerar aún más la disolución de este material, mejorando así su capacidad para liberar P para las plantas cultivadas. En la revisión de literatura hecha y en otras revisiones recientes (Osorio y Habte, 2012; Daza, 2010; Londoño, 2010; Osorio, 2003) no se ha encontrado trabajos sobre disolución microbial de RP previamente aciduladas, por tanto se cree que este es el primer reporte hecho.

Futuras investigaciones deberían centrarse en la sostenibilidad de los sistemas agrícolas actuales, focalizándose en la EDRP de *A. niger* bajo condiciones de campo y combinar con alternativas biotecnológicas viables, sencillas y de fácil aplicación tales como hongos

micorrizales que impacten favorablemente la relación suelo-planta en diferentes especies vegetales.

## 2.6 Bibliografía

- [1] ACHAL V, SAVANT VV, REDDY MS. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. Soil Biol Biochem. 2007; 39:695–699.
- [2] AHUJA A, GHOSH SB, D'SOUZA SF. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. Bioresource Technol. 2007; 98:3408–3411.
- [3] ALAM S, KHALIL S, AYUB N, RASHID M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. Int J Agric Biol. 2002; 4:454–458.
- [4] BARROSO CB, NAHAS E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. Appl Soil Ecol. 2005; 29:73–83.
- [5] BEN-FARHAT M, JORDAN MJ, CHAOUECH-HAMADA R, LANDOULSI A, SOTOMAYOR JA. Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. J Agr od Chem. 2009; 57:10349-10356.
- [6] BOJINOVA D, VELKOVA R, IVANOVA R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. Bioresource Technol. 2008; 99:7348–7353.
- [7] CHUANG CC, KUO YL, CHAO CC, CHAO WL. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. Biol Fertil Soils. 2007; 43: 575–584.
- [8] CONSENSUS STATEMENT DECLARATION. Sustainable phosphorus summit. Tempe, Arizona, USA: ASU School of Life Sciences; 2011.
- [9] CRAMER MD. Phosphate as a limiting resource: introduction. Plant Soil. 2010; 334:1-10.
- [10] CUNNINGHAM JE, KUIACK C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. Appl Environ Microb. 1992; 58:1451-1458.
- [11] DAZA PC. Aislamiento de microorganismos de la rizosfera de *Leucaena leucocephala* y evaluación de su uso potencial en la rehabilitación de suelos degradados [tesis de maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

- [12] DE-FREITAS JR, BANERJEE MR, GERMIDA JJ. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus*). *Biol Fertil Soils*. 1997; 24:358-364.
- [13] DOYLE M., BEUCHAT L., MONTVILLE T. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. España, 2001. Acribia.
- [14] FAO. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal No. 13 Roma; 2007.
- [15] GOENADI DH, SISWANTO, SUGIARO Y. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Sci Soc Am J*. 2000; 64:927–932.
- [16] GYANESHWAR P, PAREKA LJ, ARCHANA G, PODLE PS, COLLINS MD, HUSTON RA, et al. Involvement of a Phosphate Starvation Inducible Glucose Dehydrogenase in Soil Phosphate Solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 171(2):223-229.
- [17] HAMDALI H, SMIRNOV A, ESNAULT C, OUHDOUCH Y, VIROLLE MJ. Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Appl Soil Ecol*. 2010; 44:24-31.
- [18] HAMMOND LL, CHIEN SH, POLO JR. Phosphorus availability from partial acidulation of two phosphate rocks. *Fert Res*. 1980; 1(1):37-49.
- [19] ILLMER P, BARBATO A, SCHINER F. Solubilization of hardly soluble  $\text{AlPO}_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem*. 1995; 27:265-270.
- [20] ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol Biochem*. 1992; 24:389-395.
- [21] JAYASINGHEARACHCHI HS, SENEVIRATNE G. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Soil Biol Biochem*. 2006; 38:405-408.
- [22] KANG SC, PANDEY P, KHILLON R, MAHESHWARI DK. Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp. PS 104 in soil amended medium. *J Environ Biol*. 2008; 29:743-746.
- [23] LONDOÑO AA. Efecto de la inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de fósforo en la absorción de fosfato y crecimiento de *Leucaena leucocephala* en un oxisol [tesis de maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

- [24] MATHEWS CK, VAN-HOLDE KE, AHERN KG. Biochemistry. 3 ed. San Francisco: Benjamin/Cummings; 2000.
- [25] MITTAL V, SINGH O, NAYYAR H, KAUR J, TEWARI R. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield. Soil Biol Biochem. 2008; 40:718–727.
- [26] MURPHY J, RILEY JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chim Acta. 1962; 27:31-36.
- [27] NARSIAN V, PATEL HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. Soil Biol Biochem. 2000; 32:559–565.
- [28] OBERSON A, BUNEMANN EK, FRIESEN DK, RAO IM, SMITHSON PC. Improving phosphorus fertility in tropical soils through biological interventions. In: Uphoff N (edn) Biological approaches to sustainable soil systems. Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2006. p. 531-546.
- [29] OLIVEIRA CA, ALVES VMC, MARRIEL IE, GOMES EA, SCOTTI MR, CARNEIRO NP, *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biol Biochem. 2008; 41:1-6.
- [30] OSORIO N.W. Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms 392 p. 2008.
- [31] OSORIO NW, HABTE M. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. Arid Land Res Mgmt. 2001; 15:263-274.
- [32] OSORIO NW. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de P de tres suelos de Hawai [tesis de maestría]. Honolulu: Universidad de Hawaii; 2003.
- [33] OSORIO NW., HABTE M. Effect of Nitrogen Form on the Effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. J Biofertil Biopestici. 2012; 3:1-4.
- [34] OSORNO L. Bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones *in vitro* [tesis de maestría]. Medellín: Universidad de Colombia; 2013.
- [35] PAIVA-COUTINHO F, WAGNER-PEREIRA F, MAYUMI A, YANO-MELO. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Ecol Eng. 2012; 42:85-89.
- [36] PRADHAN N, SUKLA LB. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. Afr. J. Biotechnol. 2005; 5:850-854.



- [37] REDDY MS, KUMAR S, BABITA K. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technol. 2002; 84:187-189.
- [38] REYES I, BERNIER L, SIMARD RR, ANTOUN H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. FEMS Microbiol Ecol. 1999; 28:291-295.
- [39] SABER WIA, GHANEM KM, EL-HERSH MS. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mung bean plants. Res J Microbiol. 2009; 4:235-250.
- [40] SAHU SN, JANA BB. Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate solubilizing bacteria. Ecol Eng. 2000; 15:27-39.
- [41] SESHADRI S, IGNACIMUTHU S, LAKSHMINARASIMHAN C. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. Chem Eng Commun. 2004; 191:1-10.
- [42] SHARAN A, SHIKHA, DARMWALN S, GAUR S. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. World J. Microbiol. Biotechnol. 2008; 24:753-759.
- [43] SINGH H, REDDY MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. Eur J Soil Biol. 2011; 47:30-34.
- [44] SPERBER JI. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Aust J Agr Res. 1958; 9:778-781.
- [45] VASSILEV N, EICHLER-LÖBERMANN B, VASSILEVA M. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95:851-859.
- [46] VASSILEV N, VASSILEVA M, BRAVO V, FERNÁNDEZ-SERRANO M, NIKOLAEVA I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. Ind Crops Prod. 2007; 26:332-336.
- [47] VASSILEV N, VASSILEVA M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. Appl Microbiol Biot. 2003; 61:435-440.
- [48] VYAS P, RAHI P, CHAUHAN A, GULATI A. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. Mycol Res. 2007; 111:931-938.
- [49] WHITELAW M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Adv Agron. 2000; 69:99-151.

- [50] XIAO CQ, CHI RA, HUANG XH, ZHANG WX, QIU GZ, WANG DZ. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecol Eng.* 2008; 33:187-193.
- [51] XUAN Y, XU L, TIAN-HUI Z, GUANG-HAI L, CUI M. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur J Soil Biol.* 2012; 50:112-117.
- [52] YADAV RS, TARAFDAR JC. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biol Biochem.* 2003; 35:1-7.
- [53] YUSDAR H, ANUAR AR, HANAFI M, AZIZAH H. Analysis of phosphate rock dissolution determining factors using principal component analysis in some acid Indonesian soils. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2007; 38:273-282.

### 3. Capítulo 3: Efecto de la inoculación con un hongo solubilizador de fósforo y una bacteria fijadora de nitrógeno sobre el desarrollo de plántulas maíz y fríjol micorrizadas

#### 3.1 Resumen

Un experimento bajo condiciones de invernadero fue realizado para determinar la interacción entre un hongo solubilizador de fósforo (*Aspergillus niger*) y una bacteria fijadora de nitrógeno (*Azospirillum* sp.), sobre la nutrición y el crecimiento de plántulas de maíz y fríjol micorrizadas y fertilizadas o no con RP del Norte de Santander acidulada (RPA) o no-acidulada (RPNA). Para este propósito, un sustrato (suelo:arena, 1.5:1, V:V) fue fertilizado con RP del Norte de Santander (0 ó 300 mg kg<sup>-1</sup> de RPA o RPNA) y se inoculó o no-inoculó con uno o ambos microorganismos. Cuando se añadió la RPNA aumentó significativamente la absorción de P y el crecimiento de las plántulas de maíz y fríjol; sin embargo, el efecto fue significativamente mayor cuando *A. niger* fue concomitantemente inoculado. En el sustrato no-fertilizado o fertilizado con la RPA, las plántulas crecieron poco y no hubo respuesta significativa a la inoculación individual o dual con los microorganismos. La inoculación con *Azospirillum* sp. no mostró efecto alguno.

**Palabras clave:** *Aspergillus niger*, *Azospirillum* sp., Roca fosfórica acidulada, Roca fosfórica no-acidulada

#### 3.2 Introducción

El nitrógeno (N) y el fósforo (P) son elementos esenciales para el desarrollo de las plantas (Osorio, 2014). La deficiencia de estos se constituye en una limitante en la

productividad vegetal (Olaleye *et al.*, 2012; Osorio, 2011). Para lograr altos rendimientos y hacer rentable la actividad agrícola se requiere de un buen suministro de ellos en el sistema. Tradicionalmente, dicho suministro se logra con altas dosis de fertilizantes solubles; sin embargo, este manejo es insostenible debido a los altos costos, la baja eficiencia de la fertilización y los riesgos ambientales que este ocasiona (Paiva-Coutinho *et al.*, 2012; Singh y Reddy, 2011; Elkoca *et al.*, 2010).

Como modelo de esta problemática se tomaron dos especies vegetales de interés socioeconómico en el país: maíz y frijol. Con el interés de aumentar el rendimiento en los sistemas de cultivo tradicional, en donde es necesario reducir los costos de producción, especialmente el de los fertilizantes (FENALCE, 2010).

Por lo anterior, es necesario generar alternativas biotecnológicas que garanticen rendimientos competitivos, al tiempo que protege la salud de los suelos (Khan *et al.*, 2007).

Una posibilidad es el uso de rocas fosfóricas (RP); sin embargo, estos materiales son de baja disolución y lenta liberación de P, por tanto, un poco más de reactividad siempre es deseada (FAO, 2007). Se sabe que, la solubilidad de la RP se mejora cuando se usan organismos capaces de disolverla, como es el caso de los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) (Khan *et al.*, 2007; Whitelaw, 2000; Kucey *et al.*, 1989).

*Aspergillus niger* es uno de los microorganismos que más se encuentra cuando se evalúan MSP en la rizósfera (Tallapragada y Seshachala *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2009;). La solubilización de RP por *Aspergillus* sp. ha sido demostrada bajo condiciones *in vitro* (Jain *et al.*, 2012; Tallapragada y Seshachala *et al.*, 2012; Bojinova *et al.*, 2008; Barroso *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2002; Vassileva *et al.*, 1998; Vassilev *et al.*, 1996). Los MSP tiene efectos interactivos con otros microorganismos del suelo; particularmente, con hongos micorrizales (HM), con los cuales se constituyen en una estrategia biológica que mejora la absorción de P por las plantas y, de esta manera, estimula el crecimiento y la nutrición vegetal (Londoño, 2010; Osorio y Habte, 2009; Qin *et al.*, 2009; Osorio y Habte, 2001; Kim *et al.*, 1998; Toro *et al.*, 1997; Piccini y Azcon, 1987).

Para mejorar el suministro de N a las plantas, una opción viable es el uso de bacterias fijadoras de N (BFN) (Somers *et al.*, 2004; Tien *et al.*, 1979). Las bacterias del género *Azospirillum* son fijadoras de N<sub>2</sub> y promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994).

Existen reportes en donde se ha determinado que hay efectos benéficos en el desarrollo de las plantas mediante la coinoculación de BFN y HM. Vásquez *et al.* (2000) reportaron que la inoculación dual de *Glomus deserticola* y *A. brasilense* aumentó significativamente el crecimiento de plantas de maíz en comparación con el control (no-inoculado) y los tratamientos de inoculación simple. Indicando la existencia de compatibilidades funcionales entre ellos (Azcón *et al.*, 1991).

Además que las poblaciones de *Azospirillum* spp., aumentaron en los tratamientos inoculados con micorrizas. Estos resultados están de acuerdo a otras investigaciones que observaron mejor supervivencia de *Azospirillum* en las raíces de plantas micorrizadas (Belimov *et al.*, 1999; Pacovsky, 1989).

En experimentos realizados por Irizar *et al.* (2002) en cereales, leguminosas y cítricos incrementaron el rendimiento con *A. brasilense*, *Rhizobium etli*, *Glomus intraradices*, el incremento en frijol fue de 36%. En éste mismo cultivo, Garza *et al.* (2001) indicaron que la combinación de *Azospirillum* y micorriza arbuscular también incrementó el rendimiento de grano, altura de planta, número de vainas por planta y peso de 100 semillas.

Aunque es claro que existen otros modelos de fijación biológica de N más efectivos para el frijol, como es la fijación simbiótica a través de *Rhizobium* (Lodwig y Poole, 2003; Herouart *et al.*, 2002; Oke y Long, 1999), el uso de *Azospirillum* es atractivo para mejorar la absorción de otros nutrientes, mediante la inducción en el aumento del desarrollo de pelos radicales (Burdman *et al.*, 1996; Itzigsohn *et al.*, 1995; Okon y Kapulnik, 1986).

La hipótesis en esta investigación es que la coinoculación de MSP y BFN puede favorecer la nutrición y el crecimiento vegetal de especies micorrizadas; tal efecto interactivo de estos microorganismos puede depender del tipo RP aplicada.

El objetivo de este estudio fue determinar la interacción de *A. niger* y *Azospirillum* sp. sobre la nutrición y el crecimiento de plántulas de maíz y frijol micorrizadas fertilizadas con RP del Norte Santander acidulada o no-acidulada.

### 3.3 Materiales y métodos

#### 3.3.1 Preparación del sustrato

Se utilizó un sustrato compuesto por suelo y arena en relación (1.5:1, V:V). Las propiedades fisicoquímicas fueron determinadas en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, con los siguientes resultados: 72 %

arena, 12 % limo, 16 % arcilla, textura franco arenosa (Bouyoucos); pH 4.9 (Agua, 1:1); contenido materia orgánica 4.3 % (Walkley y Black); Al  $0.9 \text{ cmolc kg}^{-1}$  (KCl 1 M); Ca, Mg, y K  $1.3, 0.65, 0.14 \text{ cmolc kg}^{-1}$  (Acetato de amonio 1 M), respectivamente; capacidad de intercambio catiónico efectiva  $3 \text{ cmolc kg}^{-1}$ ; P  $13 \text{ mg kg}^{-1}$  (Bray II); P soluble  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.01 \text{ M CaCl}_2$ ); S 11 (Fosfato monocálcico  $0.008 \text{ M}$ ); Fe, Mn, Cu y Zn 215, 10, 1,  $14 \text{ mg kg}^{-1}$  (Olsen-EDTA), respectivamente; B, no detectable (agua caliente).

El pH del sustrato se ajustó a 6.0 a través del uso de carbonato de calcio (Uchida y Hue, 2000) y la concentración de P en la solución se ajustó a un valor de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ , a través de una isoterma de adsorción de fósforo (Fox y Kamprath, 1970).

Para el establecimiento de las plantas se utilizaron bolsas plásticas con capacidad para contener 2500 g de sustrato en base seca.

### 3.3.2 Preparación del inóculo

*Rhizophagus fasciculatus* (= *Glomus fasciculatum*) fue proporcionado por el Laboratorio de Ecología y Conservación Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. El HM fue originalmente aislado de un cultivo de maíz en Fredonia-Antioquia. Se multiplicó en raíces de maíz, que fueron cultivadas en un sustrato compuesto de suelo y arena (2:1, V:V) durante 4 meses como se describe por Habte y Osorio (2001). El inóculo consistió de esporas, hifas extraradicales y fragmentos de raíces colonizadas; y se cuantificó el número de propágulos infectivos para evaluar la efectividad de éste, mediante la técnica del número más probable (NMP) (Figura 3-1) (Habte y Osorio, 2001; Porter, 1979).

Para la cual se prepararon diluciones consecutivas (en base 10) del inóculo micorrizal usando como diluyente suelo estéril (pH 6.2; P soluble  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ). La planta indicadora fue *Leucaena leucocephala*, se escogió por la alta dependencia micorrizal, fácil germinación y rápido crecimiento. El procedimiento consistió en depositar 270 g del suelo estéril en un vaso desechable y posteriormente adicionar 30 g de inóculo micorrizal y mezclar uniformemente (dilución  $10^{-1}$ ). Luego, se tomó 30 g de la primera dilución ( $10^{-1}$ ) y se llevó a otro vaso ( $10^{-2}$ ) y se mezcló. Esta operación se realizó sucesivamente hasta obtener la dilución  $10^{-5}$  usando en cada dilución cinco repeticiones. Las plantas se dejaron crecer en invernadero durante seis semanas. Al final del periodo de crecimiento se recogieron las raíces, se lavaron, se decoloraron, se tiñeron con Fucsina ácida y se observaron al estereoscopio (Phillips y Hayman, 1970; Brundrett *et al.*, 1996; Giovannetti

y Mosse, 1980). En cada una de las diluciones se contabilizaron las repeticiones que exhibieron raíces colonizadas (+) y no colonizadas (-). Se utilizaron las tres últimas diluciones con al menos una repetición con valor positivo, se emplearon estos valores como p1 (5), p2 (5) y p3 (4), en orden descendente. Estos números se ubicaron en la tabla desarrollada por Cochran (1950) y el resultado obtenido (16) se multiplicó por factor de dilución intermedio ( $10^3$ ), luego este valor se dividió por la cantidad del inóculo aplicado (30 g), dando como resultado 533 propágulos infectivos por gramo.

**Figura 3- 1:** Técnica del número más probable.



*A. niger* (As) continúa en el segundo experimento al demostrar su alta efectividad para disolver RP. Se multiplicó durante tres días a 28°C en cajas de Petri con el medio YMA (composición en g L<sup>-1</sup>: extracto de levadura 4, extracto de malta 10, glucosa 4, agar 20) autoclavado (120°C, 0.1 MPa, 15 min). Las colonias fueron retiradas de la superficie del agar con un asa estéril y luego suspendidas en agua desionizada estéril, la suspensión fue ajustada al tubo No. 5 de Mc Farland, y conservada en nevera a 4°C para su posterior uso. A partir de la suspensión se cosecharon las esporas utilizando 10 mL de solución de Tween 80 al 0.1%. Se realizó el recuento en una cámara Neubauer hasta obtener la concentración final conocida ( $10^5$  esporas mL<sup>-1</sup>).

*Azospirillum* sp. (Azo) fue suministrado por Sobiotech S.A.S. Ésta fue originalmente aislada de un cultivo de maíz en Santa Elena-Antioquia. El microorganismo se multiplicó durante tres días a 32°C en cajas de Petri con el medio específico para fijadores de N de vida libre (Dobereiner y Day, 1979) autoclavado (120°C, 0.1 MPa, 15 min). Las colonias

fueron retiradas de la superficie del agar con un asa estéril y suspendidas en agua desionizada estéril, la suspensión fue ajustada al tubo No. 5 de la escala Mc Farland, y conservada en nevera a 4°C para su posterior uso. La concentración se cuantificó por el método de diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa por el método de microgota (Doyle M *et al.*, 2001). La concentración utilizada fue 7.64 Log 10 UFC mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.3 Plantas hospederas

Semillas de maíz y frijol cargamanto fueron tratadas con alcohol 70 % e hipoclorito de sodio 0.05 % y se enjuagaron varias veces con agua estéril. Estas se colocaron sobre toallas de papel húmedas estériles para germinar durante 2 días. Tres a cinco semillas germinadas se sembraron en cada bolsa.

### 3.3.4 Tratamientos

A las unidades experimentales se les aplicó 0 ó 300 mg kg<sup>-1</sup> de RP acidulada (RPA) o no-acidulada (RPNA). Esta dosis de fertilización fosfórica (300 mg kg<sup>-1</sup> de RP) se estableció de acuerdo a lo reportado por Osorio y Habte (2013) en donde el efecto de la inoculación con *Glomus fistulosum* aumentó significativamente la captación de Pi y el crecimiento de *Leucaena leucocephala* cuando se añadió de 300-600 mg kg<sup>-1</sup> de RP. Como fuente de P se usó la RP del Norte de Santander, esta se sostuvo para el presente experimento al afectar positivamente la concentración de P soluble en el medio, independiente del inóculo microbiano utilizado para dicha disolución. Además se quiso ver los efectos sobre las especies vegetales de la fertilización o no con RPA y RPNA.

Las RP (acidulada y no-acidulada) fueron pasadas por un tamiz de 500 µm y retenidas en un tamiz de 250 µm. El contenido de P de las RP fue de 11 y 12.8 %, respectivamente; y al preparar una suspensión acuosa al 10 % la concentración de P soluble fue de 2.31 y 1.05 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. .

Todas las unidades experimentales fueron inoculadas con 62.5 g de *Rhizophagus fasciculatus*/bolsa. El inóculo micorrizal se mezcló uniformemente con la mitad superior de las bolsas plásticas.

Por otro lado, al sustrato se le aplicó o no 25 mL de los inóculos microbianos. Los inóculos fueron pipeteados directamente en los sitios de siembra.



Las plantas fueron cultivadas bajo luz natural en el invernadero de Sobiotech S.A.S., (6°15'07'' N 75°25'42'' W, altitud 2117 m) (Guarne, Antioquia, Colombia). El sustrato se mantuvo entre 50-60 % de su máxima capacidad de retención de agua. Semanalmente, 20 mL de la solución nutritiva Hoagland -libre de P- fueron aplicados.

### 3.3.5 Variables a medir

El contenido de P foliar se monitoreó en función del tiempo, las medidas iniciaron el décimo día después de la germinación (ddg) y se repitió a intervalos de 15 días. Las plantas se cosecharon a los 60 ddg. La altura de las plantas se determinó midiendo la longitud desde el cuello de la raíz hasta la yema axial para el caso del frijol cargamanto, y desde el cuello de la raíz hasta el fin del sistema caulinar para el caso del maíz. La parte aérea se secó a 70°C durante 48 horas y se determinó masa seca. El contenido de P de la parte aérea se determinó por el método azul molibdato (Murphy y Riley, 1962), luego de calcarla a 500°C durante 3 horas en mufla y de disolver las cenizas en 1 mL de HCl 1 M y 9 mL de agua destilada (Habte *et al.*, 1987). Además, se observó la presencia de los microorganismos inoculados, en el caso de *R. fasciculatus* con el porcentaje de colonización; para esto, las raíces se aclararon con KOH al 10% (Phillips y Hayman, 1970), durante 24 horas a temperatura ambiente; se enjuagaron con abundante agua y se acidificaron con HCl al 10% durante 5 minutos. Posteriormente, las raíces se tiñeron con fuscina acida al 0,15% (Brundrett *et al.*, 1996), durante 48 horas; el exceso de colorante se removió con una solución de lacto-glicerol (63 mL de glicerina, 63 mL de agua y 874 mL de ácido láctico) durante 24 horas. Las raíces fueron almacenadas en glicerina acidificada hasta su evaluación al estereomicroscopio. La colonización micorrizal se determinó a través del método de intersección de la cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980) y para el caso de *A. niger* y *Azospirillum* sp. se determinó su presencia en las raíces (rizoplaneo), esta fue evaluado en 20 fragmentos de raíces de 1 cm, el cual fue tomado de manera aleatoria en cada planta (Osorio y Habte, 2013; Hallman *et al.*, 2006). Los fragmentos de raíces fueron transferidos a cajas Petri con medios específicos por grupo funcional (Osorio, 2008; Dobereiner y Day, 1979). Luego de tres días, se contó en cuantos fragmentos de raíces hubo presencia de los microorganismos y se expresó en porcentaje.

Esta metodología se usó para determinar la presencia de los microorganismos asociados con la superficie de la raíz (rizoplaneo) de las especies vegetales, y comprobar que se haya establecido asociación entre los microorganismos evaluados y ellas.

En la rizósfera existe una considerable densidad poblacional de microorganismos, pudiendo alcanzar valores superiores a  $10^9$  células por  $\text{cm}^3$ . Los valores máximos, por lo general, se encuentran en el rizoplaneo y descienden al alejarse de la superficie radical (Johansson *et al.*, 2004).

### 3.3.6 Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos consistieron en una combinación factorial  $3 \times 2 \times 2$  [3 niveles de RP: 0 y  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de RPA o RPNA; 2 niveles de inoculación de *A. niger*: As+, As-; 2 niveles de inoculación *Azospirillum* sp.: Azo+, Azo-]. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron estadísticamente analizados usando análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan para determinar la separación de medias. El nivel de significancia ( $p$ ) fue  $\leq 0.05$ . Para todos los casos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (StatPoint, Inc., Herdon, Virginia, EE.UU.).

## 3.4 Resultados

El efecto de los tratamientos con RP y *A. niger* afectó, significativamente, la nutrición y el crecimiento de plantas de maíz micorrizadas (Tabla 3-1).

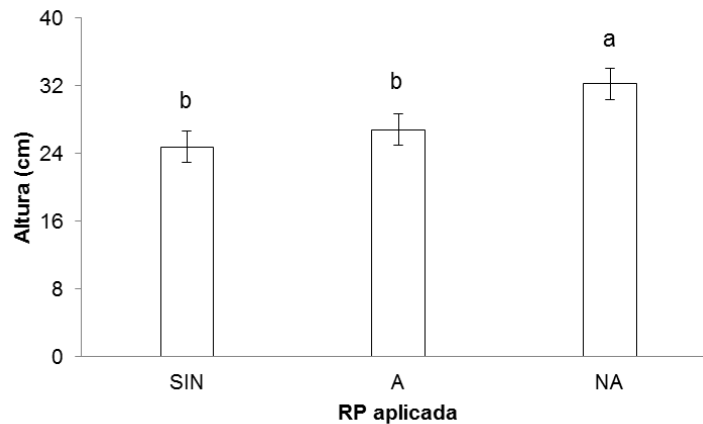
**Tabla 3-1:** Niveles de significancia del análisis de varianza para maíz.

Fuente de Variación	Altura	Masa seca aérea	Presencia Azo	Presencia As	Contenido P foliar				Concentración P foliar				CPAF
					10	25	40	55	10	25	40	55	
A: Azo	N.S.	N.S.	<b>0.000</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B: As	N.S.	<b>0.008</b>	<b>0.009</b>	<b>0.000</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.006</b>
C: RP	<b>0.020</b>	<b>0.010</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.023</b>	N.S.	N.S.	<b>0.043</b>	N.S.	<b>0.004</b>
AXB	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
AXC	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.010</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BXC	N.S.	N.S.	<b>0.034</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.027</b>	N.S.	N.S.	N.S.
AXBXC	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.010</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

<sup>N.S.</sup>: No significativo

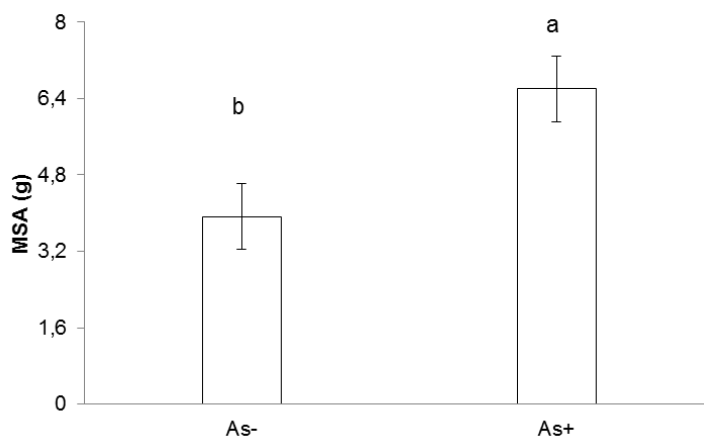
La altura del maíz aumentó significativamente ( $p<0.05$ ) con el tipo de RP empleada. Al aplicar RPNA se obtuvo un altura de 32.3 cm que fue significativamente superior a la altura de las plantas fertilizadas con RPA (26.9 cm) o no fertilizadas (24.8 cm); entre estas, no hubo diferencia significativa (Figura 3-2). Por otro lado, no se presentaron efectos significativos en la altura en función de la inoculación con *Azospirillum* sp. (Azo), *A. niger* (As) y las interacciones posibles (AzoxAs; AzoxRP; AsxRP; AzoxAsxRP) (Tabla 3-1).

**Figura 3- 2:** Altura (cm) de plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).

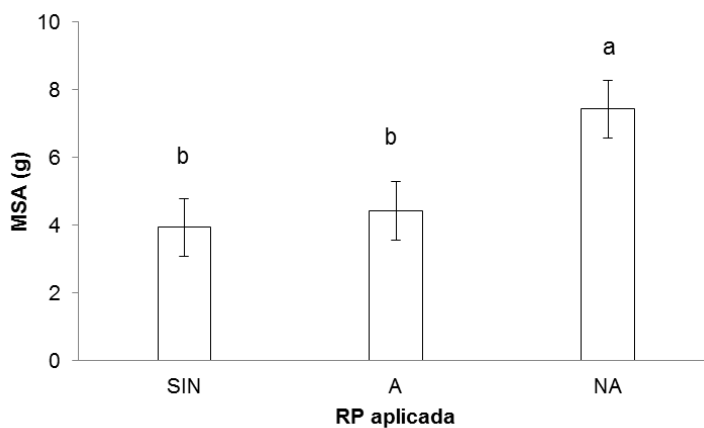


La masa seca aérea (MSA) del maíz fue significativamente mayor al inocular con *A. niger* (Figura 3-3). Así, la MSA de las plantas no inoculadas fue en promedio 3.9 g/planta; mientras que al inocular con *A. niger* (As+) la MSA fue 6.6 g/planta, lo cual representa un incremento de 68%. Igualmente, la MSA fue afectada significativamente por el tipo de RP aplicada: 7.4 g/planta al aplicar RPNA, 4.4 g/planta con RPA y 3.9 g sin aplicación de RP (Figura 3-4). Con respecto al control (SIN), la adición de RPNA fue del 88%, mientras que con RPA 12%. Los resultados estadísticos indican que no hubo efectos significativos en la MSA en función de la inoculación con *Azospirillum* sp. y las interacciones posibles (AzoxAs; AzoxRP; AsxRP; AzoxAsxRP) (Tabla 3-1).

**Figura 3- 3:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).

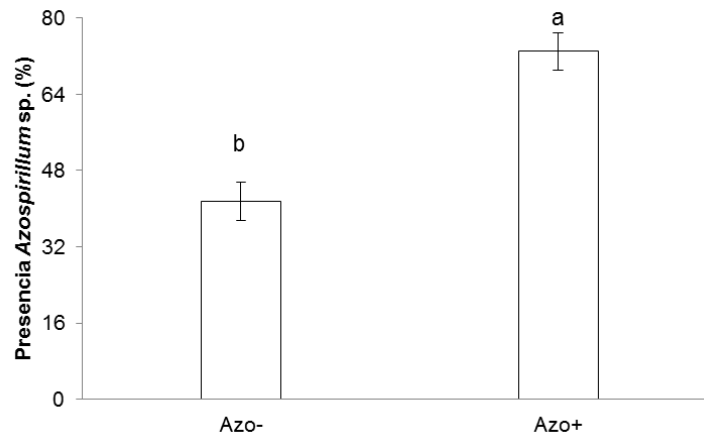


**Figura 3- 4:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).

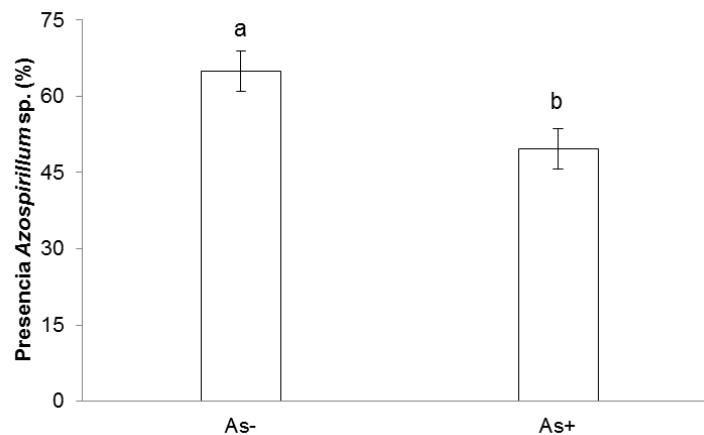


La presencia de *Azospirillum* sp. en las raíces (rizoplasma) de maíz fue significativamente mayor en aquellas inoculadas con *Azospirillum* sp. (Azo+: 73%) que en las no-inoculadas (Azo-: 42%) (Figura 3-5). Al inocular con *A. niger*, la presencia de *Azospirillum* sp. en las raíces de maíz fue reducida desde 65% (As-) a 50% (As+) (Figura 3-6).

**Figura 3- 5:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *Azospirillum* sp. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).

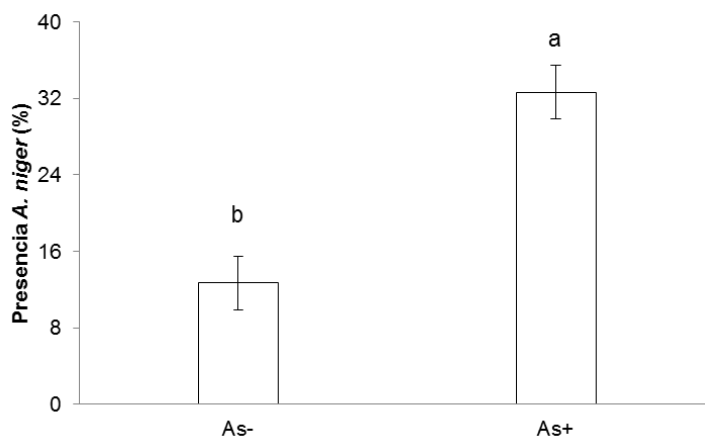


**Figura 3- 6:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).



La presencia de *A. niger* fue significativamente mayor cuando se inoculó (As+: 32.7%) con este hongo que en las plantas control no-inoculadas (As-: 12.7%), lo cual representa un incremento de 2.58 veces (Figura 3-7).

**Figura 3- 7:** Presencia de *A. niger* (%) en raíces de plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

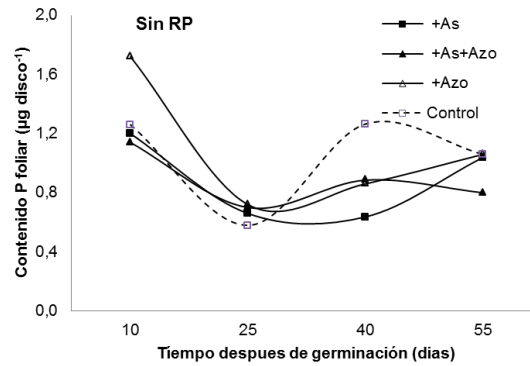


Las plantas de maíz inoculadas o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. exhibieron comportamientos similares a la fertilización o no con RP. El contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) disminuyó inicialmente, pero a partir del 25 ddg (día después de la germinación) se incrementó progresivamente hasta la cosecha (Figura 3-8).

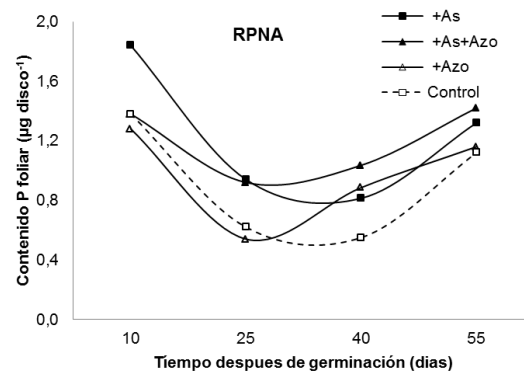
Para el 55 ddg se encontró que hubo un mayor contenido de P en la muestra foliar al aplicar la RPNA ( $1.25 \mu\text{g disco}^{-1}$ ) que con los controles no fertilizados ( $0.99 \mu\text{g disco}^{-1}$ ) (Figura 3-9).

**Figura 3- 8:** Contenido P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) en plantas de maíz micorrizadas fertilizadas con RP: (a)  $0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; (b)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPNA; (c)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación.

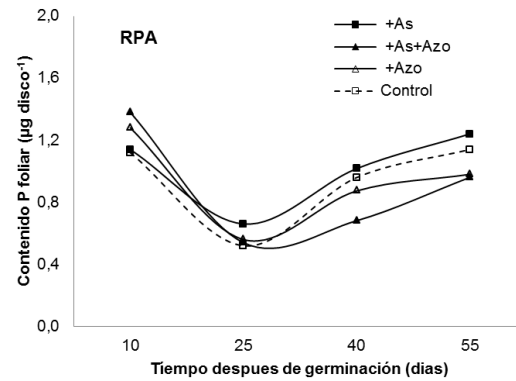
(a)



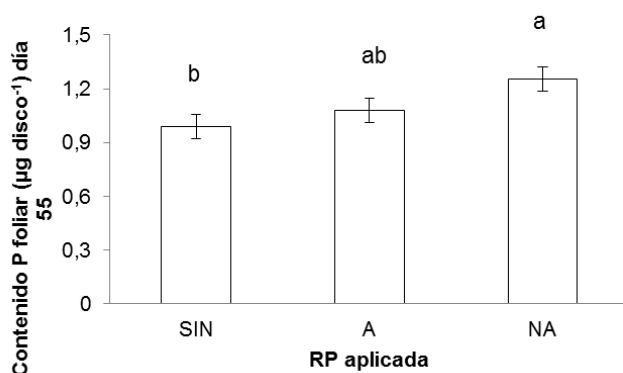
(b)



(c)



**Figura 3- 9:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 55 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



Las plantas inoculadas con *A. niger* exhibieron comportamientos similares a las plantas no-inoculadas (control) cuando se fertilizó o no con RPA. Cuando se fertilizó con RPNA la concentración de P foliar (%) disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo, siendo significativamente mayor para el 25 ddg (Figura 3-11), con un incremento del 100% (As-: 0.13%; As+: 0.26%).

Cuando el maíz fue inoculado con *Azospirillum* sp., sin fertilización fosfórica, la concentración de P foliar disminuyó con el tiempo. Sin embargo, cuando se fertilizó con RP la concentración de P foliar se redujo inicialmente, pero luego se incrementó para el 40 ddg y siguió disminuyendo hasta la cosecha.

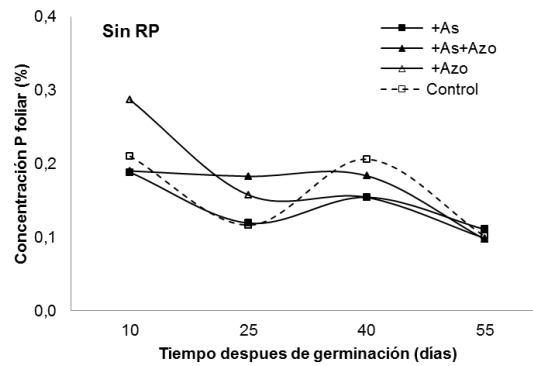
En las plantas inoculadas con ambos microorganismos, la concentración de P foliar se mantuvo en el tiempo hasta el 40 ddg, reduciéndose hasta la cosecha, cuando se fertilizó o no con RPNA. Cuando se fertilizó con RPA la concentración de P foliar disminuyó paulatinamente con el tiempo (Figura 3-10).

Para el 40 ddg se encontró que hubo un mayor concentración de P foliar al aplicar la RPNA (0.12%) que con los controles no fertilizados (0.10%) (Figura 3-12).

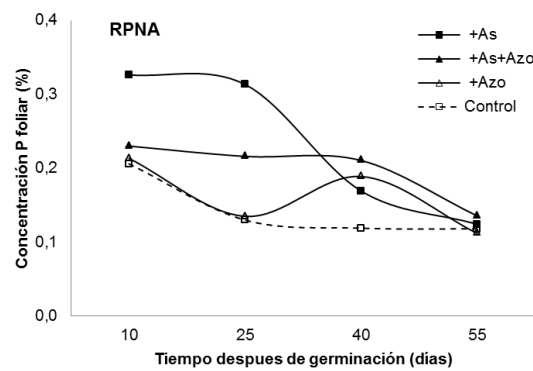


**Figura 3- 10:** Concentración de P foliar (%) en plantas de maíz micorrizadas fertilizadas con RP: (a) 0 mg.kg<sup>-1</sup>; (b) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPNA; (c) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* a diferentes días después de germinación.

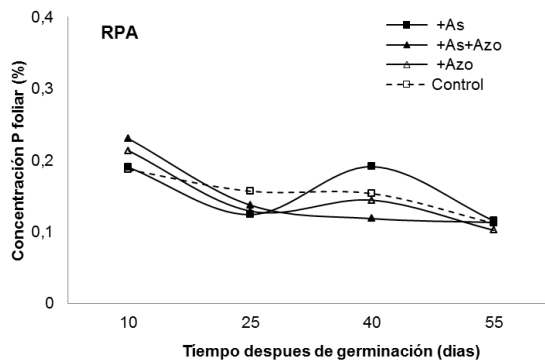
(a)



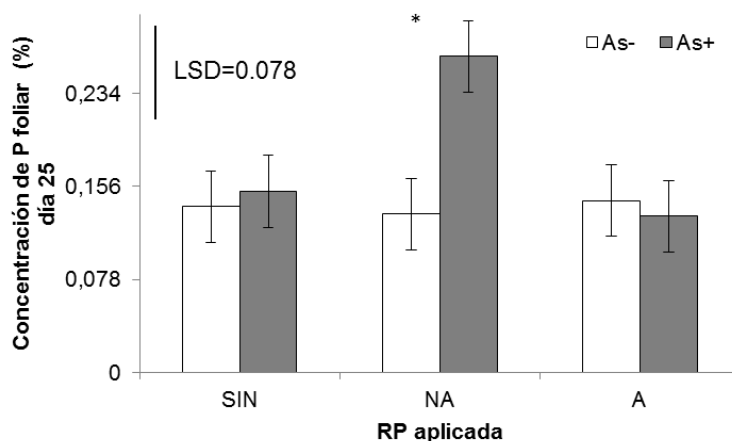
(b)



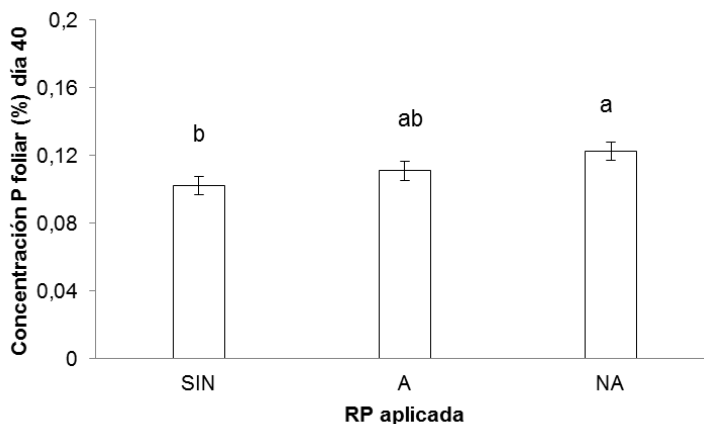
(c)



**Figura 3- 11:** Concentración de P foliar (%) 25 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 12:** Concentración de P foliar (%) al 40 ddg en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

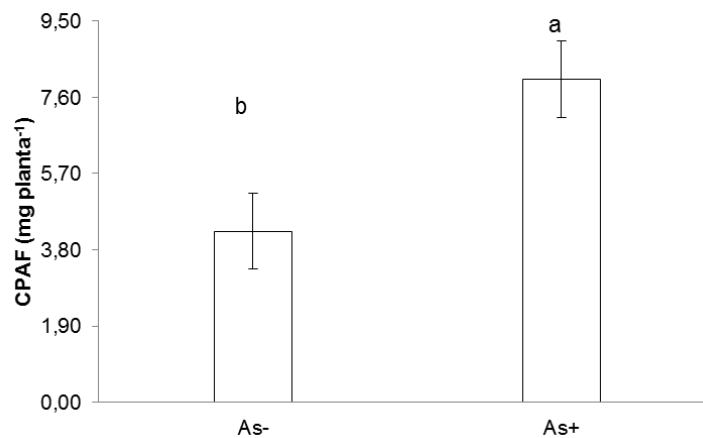


El contenido de P aéreo final (CPAF) (mg/planta) fue significativamente mayor al inocular con *A. niger* (Figura 3-13). Los valores fueron As- 4.26 mg/planta y As+ 8.05 mg/planta, que equivale a un incremento del 89%.

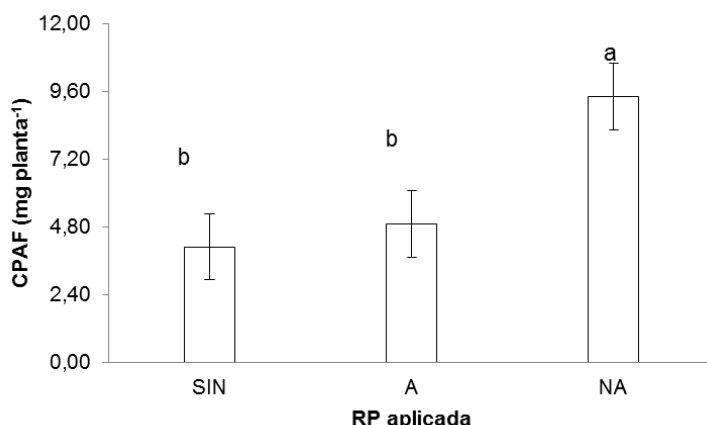
La adición de RP afectó significativamente el CPAF, así: control 4.11 mg/planta, RPA 4.92 mg/planta y RPNA 9.43 mg/planta. El valor correspondiente a la RPNA fue significativamente mayor (Figura 3-14).

Por otro lado, no se presentaron efectos significativos en el CPAF en función de la inoculación con *Azospirillum* sp. y las interacciones posibles (AzoxAs; AzoxRP; AsxRP; AzoxAsxRP) (Tabla 3-1).

**Figura 3- 13:** Contenido de P aéreo final (mg planta<sup>-1</sup>) en plantas de maíz micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 14:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de maíz micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



El efecto de los tratamientos con RP, *A. niger* y su interacción afectó, significativamente, la nutrición y el crecimiento de plantas de frijol micorrizadas (Tabla 3-2).

**Tabla 3-2:** Niveles de significancia del análisis de varianza para frijol.

Fuente de Variación	Altura	Masa seca aérea	Presencia Azo	Presencia As	Contenido P foliar				Concentración P foliar				CPAF
					10	25	40	55	10	25	40	55	
A: Azo	N.S.	N.S.	<b>0.000</b>	N.S.	<b>0.008</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B: As	<b>0.031</b>	<b>0.001</b>	N.S.	<b>0.008</b>	N.S.	N.S.	<b>0.027</b>	N.S.	<b>0.043</b>	N.S.	<b>0.023</b>	N.S.	<b>0.024</b>
C: RP	<b>0.011</b>	<b>0.003</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.019</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.003</b>
AXB	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.046</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
AXC	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.002</b>	N.S.	N.S.	N.S.
BXC	N.S.	<b>0.036</b>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.000</b>	N.S.	N.S.	<b>0.038</b>
AXBXC	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<b>0.001</b>	N.S.	N.S.	N.S.

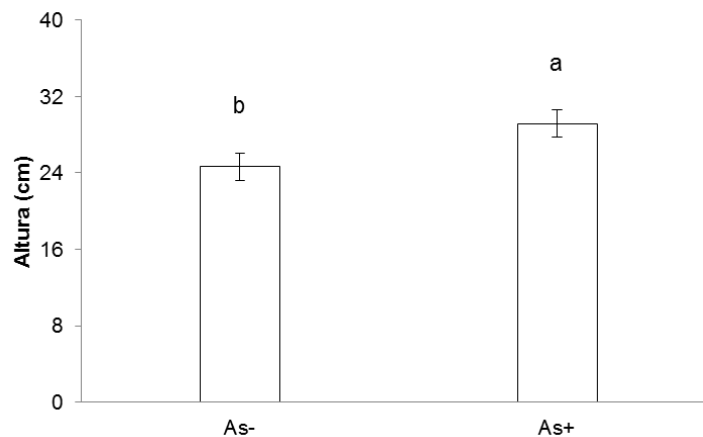
N.S.: No significativo

La altura del frijol fue significativamente mayor al inocular con *A. niger* (29.2 cm) que con el control no-inoculado (24.7 cm) (Figura 3-15), lo cual representa un incremento de 18%. Igualmente, la altura fue afectada significativamente por el tipo de RP aplicada, así al

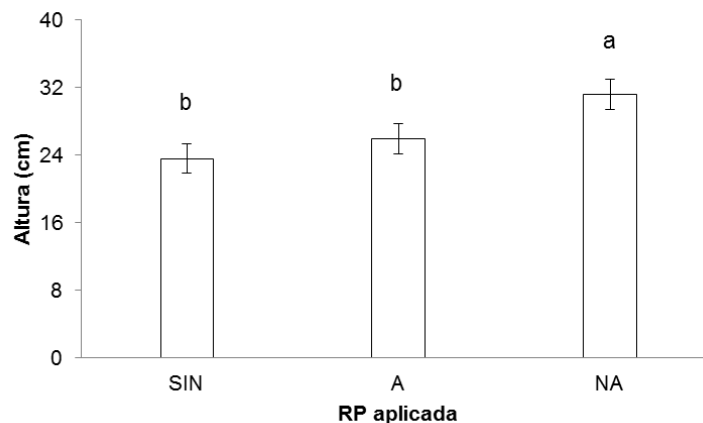
aplicar la RPNA la altura fue 31.2 cm, la cual fue significativamente mayor que con la RPA (26 cm) y el control sin adición de RP (23.6 cm) (Figura 3-16).

Por otro lado, no se presentaron efectos significativos en la altura en función de la inoculación con *Azospirillum* sp. y las interacciones AzoxAs; AzoxRP; AsxRP; AzoxAsxRP (Tabla 3-2).

**Figura 3- 15:** Altura (cm) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).



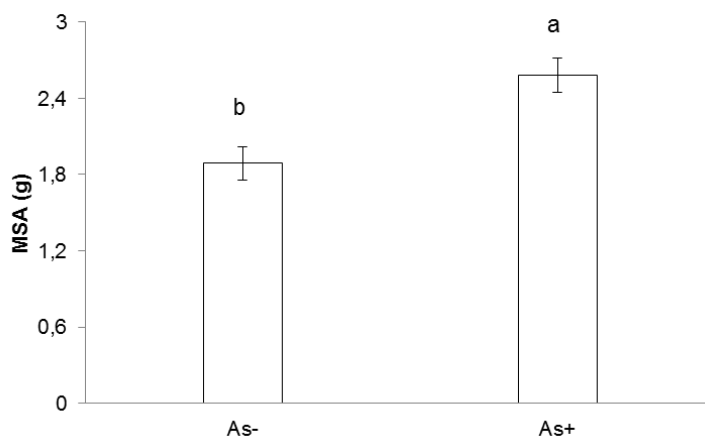
**Figura 3- 16:** Altura (cm) de plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).



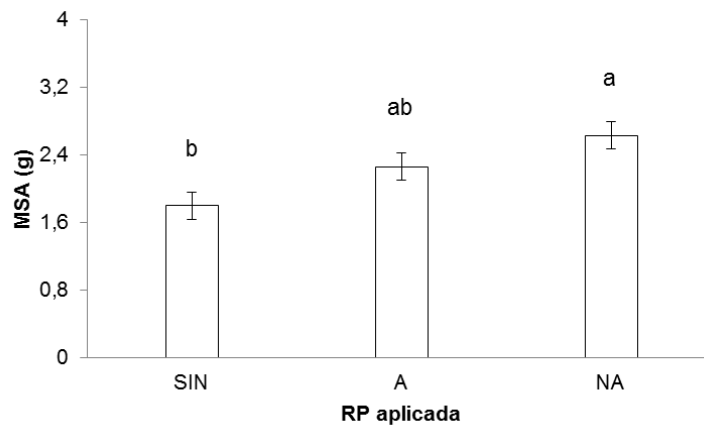
La masa seca aérea (MSA) del frijol fue afectada significativamente por los tratamientos con RP, As y la interacción RPxAs (Tabla 3-2). Así, la MSA fue significativamente mayor (37%) ( $p<0.05$ ) cuando se inoculó con *A. niger* (As+: 2.6 g/planta) que cuando no fue inoculado (As-: 1.9 g/planta) (Figura 3-17), independiente del efecto de la aplicación con RP. Igualmente, la MSA fue afectada por el tipo de RP aplicada; cuando ésta no fue acidulada (NA), la MSA fue 2.6 g/planta, con RPA y sin aplicar RP los valores fueron significativamente más bajos (RPA: 2.3 g/planta, SIN RP: 1.8 g/planta) (Figura 3-18).

Lo más relevante es que la MSA del frijol fue afectada por la interacción RPxAs (Figura 3-19). Los análisis indican que la MSA fue significativamente mayor al inocular con *A. niger* (As+: 3.32 y As-: 1.96 g/planta) solo cuando se aplicó la RP no-acidulada (RPNA); esto representa un incremento del 70%. No se detectaron efectos significativos con la inoculación al aplicar RPA ni en ausencia de RP.

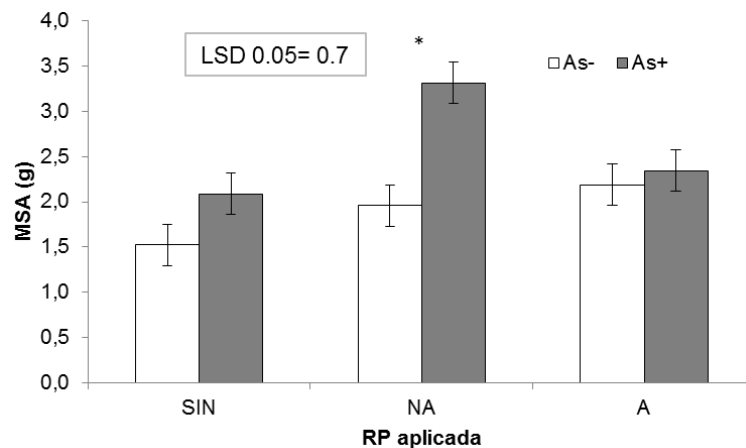
**Figura 3- 17:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).



**Figura 3- 18:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).

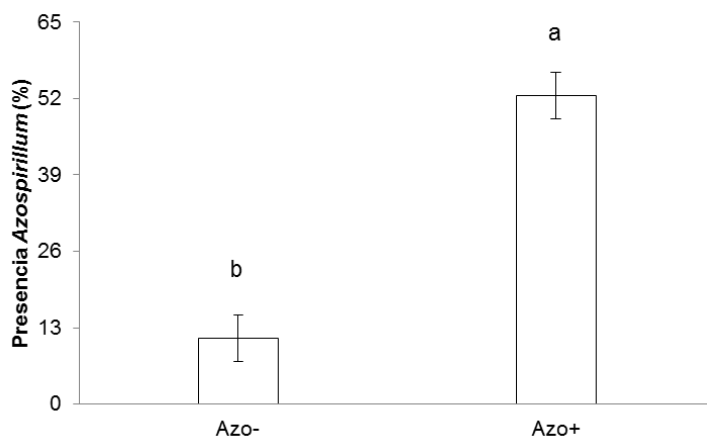


**Figura 3- 19:** Masa seca aérea (MSA) (g) de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p<0.05$ ).



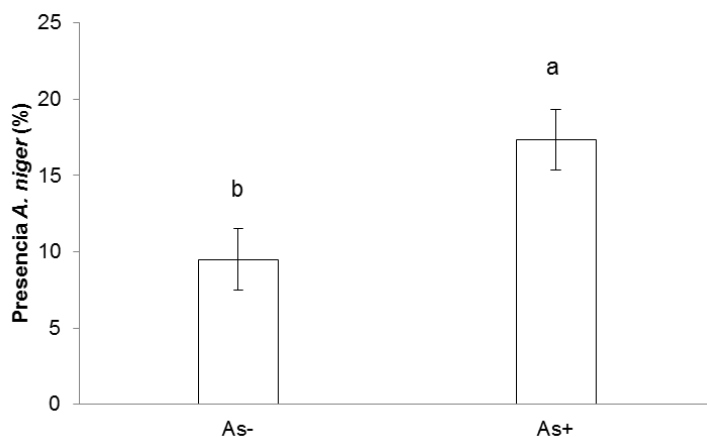
La presencia de *Azospirillum* sp. en las raíces (rizoplaneo) de las plantas de frijol fue significativamente mayor en aquellas inoculadas (Azo+: 52.5%) que en las no-inoculadas (Azo-: 11.2%), lo cual representa un incremento de 4.69 veces (Figura 3-20).

**Figura 3- 20:** Presencia de *Azospirillum* sp. (%) en raíces de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *Azospirillum* sp. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).



La presencia de *A. niger* en las raíces (rizoplasma) de las plantas de frijol fue significativamente mayor en raíces inoculadas con este hongo (As+:17.3%) que en las no-inoculadas (As-: 9.5%), lo cual representa un incremento de 82% (Figura 3-21).

**Figura 3- 21:** Presencia de *A. niger* (%) en raíces de plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ).





Las plantas de frijol inoculadas con *A. niger* exhibieron comportamientos similares a la fertilización o no con RP. El contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) disminuyó inicialmente, pero a partir del 25 ddg se incrementó progresivamente hasta el 40 ddg.

El contenido de P en la muestra foliar al 40 ddg fue significativamente mayor al inocular *A. niger* (As-:  $2.14 \mu\text{g disco}^{-1}$ ; As+:  $2.58 \mu\text{g disco}^{-1}$ ), lo cual representa un incremento de 20% (Figura 3-23).

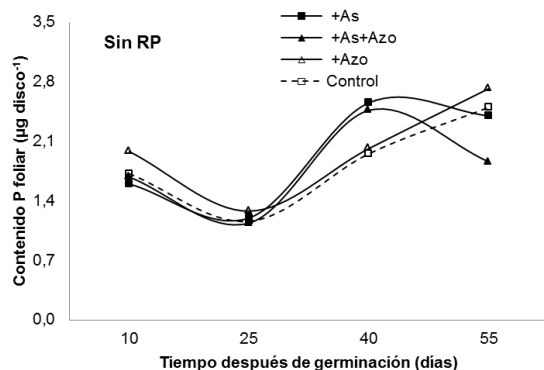
Cuando fue inoculado con *Azospirillum* sp., y fertilizado o no con RP, el contenido de P foliar se redujo inicialmente, pero luego se incrementó para el 25 ddg y siguió aumentando hasta la cosecha, mostrando un patrón similar al control.

En las plantas inoculadas con ambos microorganismos, el contenido de P foliar mostró un patrón similar al de las plantas inoculadas con *A. niger*, cuando el sustrato no fue fertilizado (SIN RP). Cuando se fertilizó con RP, el contenido de P foliar aumento paulatinamente con el tiempo a partir del 25 ddg hasta la cosecha (Figura 3-22).

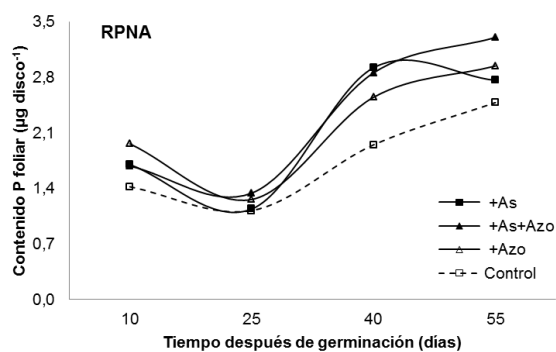
Para el 55 ddg se encontró que hubo un mayor contenido de P en la muestra foliar al aplicar la RPNA ( $2.87 \mu\text{g disco}^{-1}$ ) que con el control no fertilizado ( $2.37 \mu\text{g disco}^{-1}$ ) (Figura 3-24).

**Figura 3- 22:** Contenido P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) en plantas de fríjol micorrizadas fertilizadas con RP: (a)  $0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; (b)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPNA; (c)  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación.

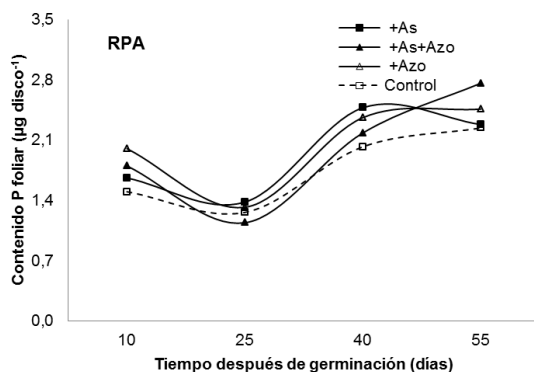
(a)



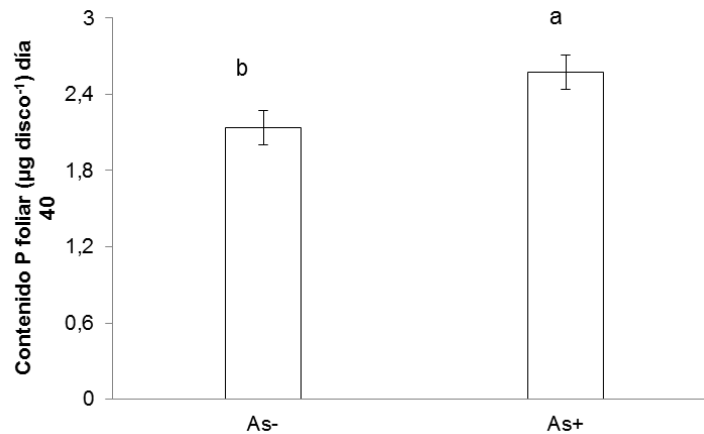
(b)



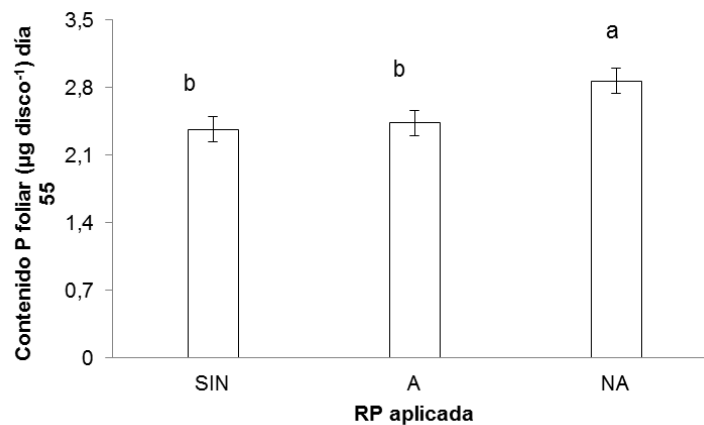
(c)



**Figura 3- 23:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 40 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 24:** Contenido de P foliar ( $\mu\text{g disco}^{-1}$ ) al 55 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



Las plantas inoculadas con *A. niger* exhibieron comportamientos similares cuando se fertilizó o no con RP. La concentración de P foliar (%) aumentó progresivamente del 25-40 ddg.

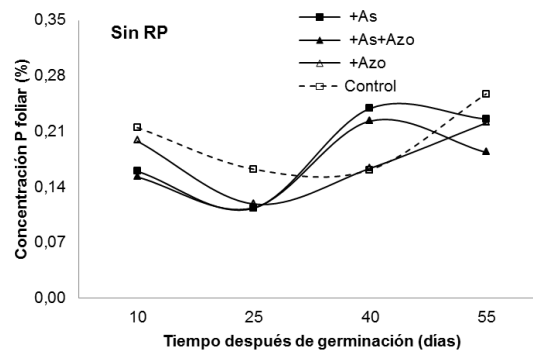
La concentración de P foliar para el 25 ddg fue significativamente mayor al inocular con *A. niger*; pero, solamente si el suelo se fertilizó con RPNA (Figura 3-26). Dicho

incremento fue del 31% (As-:0.11%; As+: 0.15%). Para el 40 ddg, la concentración de P foliar fue significativamente mayor al inocular *A. niger* (As-:0.19%; As+:0.24%), independiente de la fertilización, lo cual representa un incremento del 28% (Figura 3-27). Cuando el frijol fue inoculado con *Azospirillum* sp., fertilizado o no con RP, la concentración de P foliar se redujo inicialmente, pero luego se incrementó a partir del 25 ddg hasta la cosecha.

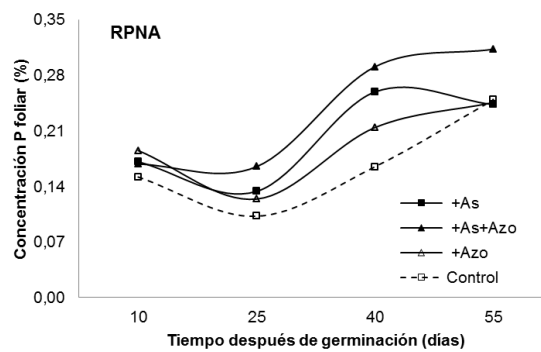
En las plantas inoculadas con ambos microorganismos, la concentración de P foliar aumentó del 25-40 ddg, reduciéndose hasta la cosecha, cuando no se fertilizó con RP. Cuando se fertilizó la concentración de P foliar aumentó paulatinamente con el tiempo (Figura 3-25).

**Figura 3- 25:** Concentración de P foliar (%) en plantas de frijol micorrizadas fertilizadas con RP: (a) 0 mg.kg<sup>-1</sup>; (b) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPNA; (c) 300 mg.kg<sup>-1</sup> RPA. Inoculada o no con *A. niger* y *Azospirillum* sp. a diferentes días después de germinación

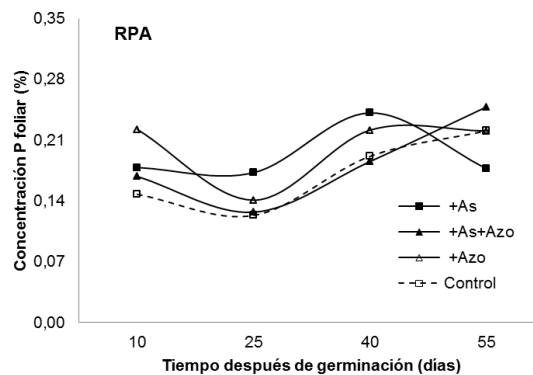
(a)



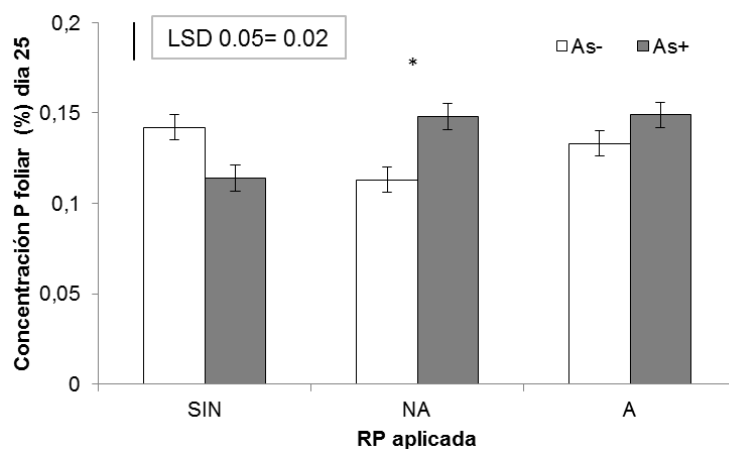
(b)



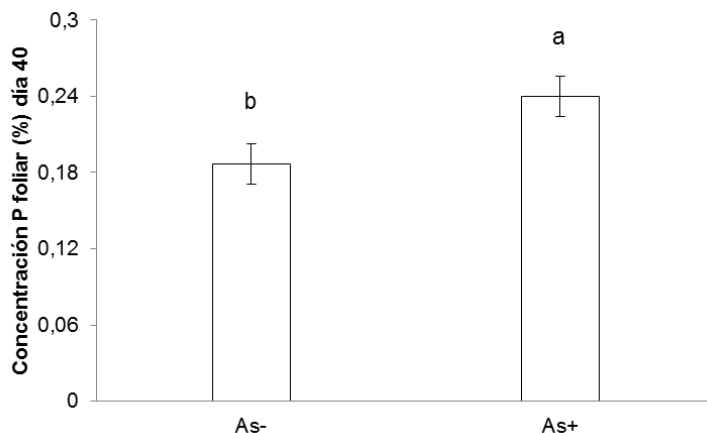
(c)



**Figura 3- 26:** Concentración de P foliar (%) 25 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con asterisco (\*) indican diferencias significativas entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 27:** Concentración de P foliar (%) al 40 ddg en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

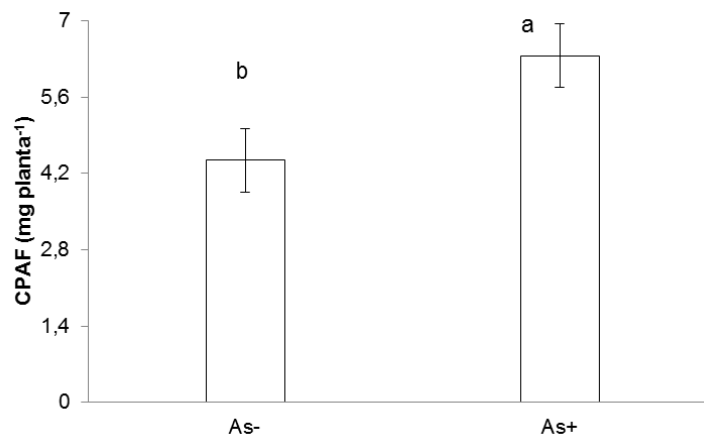


El contenido de P aéreo final (CPAF) ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) fue significativamente mayor al inocular con *A. niger* (Figura 3-28). En fríjol As- el valor fue de  $4.45 \text{ mg planta}^{-1}$  y con As+ fue de  $6.37 \text{ mg planta}^{-1}$ , lo cual representa un incremento del 43%.

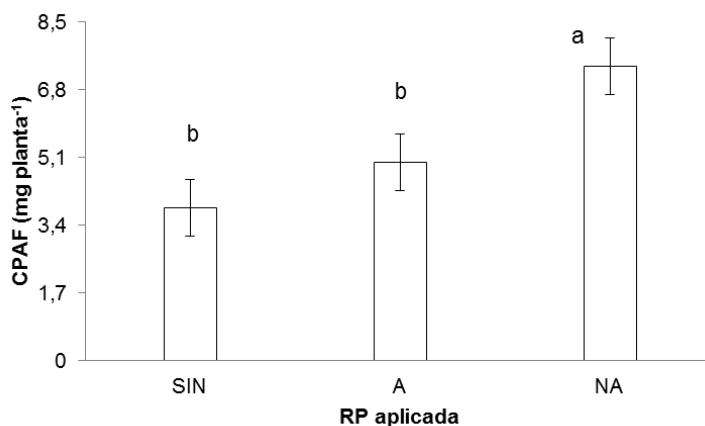
La adición de RP afectó significativamente el CPAF, así: en fríjol los valores fueron control no fertilizado  $3.85 \text{ mg planta}^{-1}$ , RPA  $4.98 \text{ mg planta}^{-1}$  y RPNA  $7.39 \text{ mg planta}^{-1}$ . Siendo significativamente mayor el valor correspondiente a la RPNA (Figura 3-29).

Adicionalmente, presentó una interacción significativa RPxAs. El CPAF se incrementó únicamente al inocular con *A. niger* en el suelo fertilizado con RPNA y no con los otros tratamientos (RPA y control). Para esta interacción, los valores fueron RPNxAs-:  $4.89 \text{ mg planta}^{-1}$ , mientras que con RPNxAs+:  $9.90 \text{ mg planta}^{-1}$ . Esto representa un incremento de 2.02 veces más P absorbido con el tratamiento con *A. niger* (Figura 3-30).

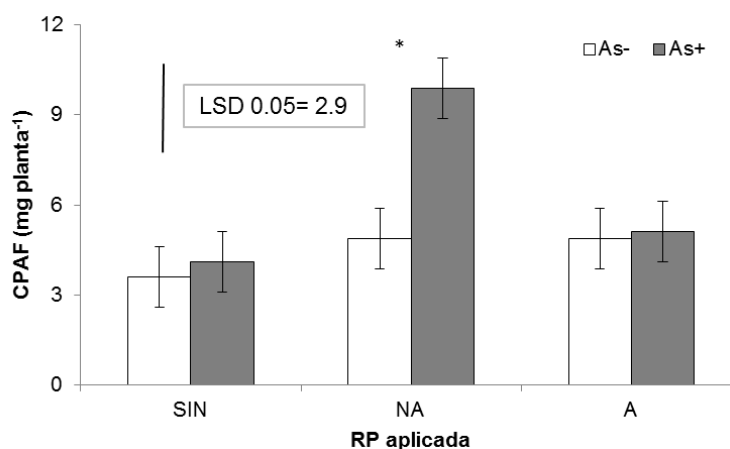
**Figura 3- 28:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de fríjol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger*. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 29:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas en función del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3- 30:** Contenido de P aéreo final ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) en plantas de frijol micorrizadas en función de la inoculación o no de *A. niger* y del tipo de RP aplicada. Las barras representan el error estándar. La columna con asterisco (\*) indica diferencia significativa entre la inoculación dada y la RP (mínima diferencia significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ).





### 3.5 Discusión

Los resultados obtenidos permitieron demostrar claramente la hipótesis de que la nutrición y el crecimiento de plantas de maíz y frijol micorrizadas dependen del efecto interactivo de los tratamientos con RP y *A. niger*, pero no con el *Azospirillum* sp.

Los efectos positivos debido a la fertilización de especies micorrizadas con RP en suelos tropicales se ha discutido extensamente (Takacs *et al.*, 2006; Lange y Vleck, 2000; Ba y Guissou, 1996; Manjunath *et al.*, 1989). Es bien conocido que las RP pueden variar mucho en eficiencia agronómica (Sale y Mokwunye, 1993). Reactividad es el término comúnmente usado para describir la efectividad agronómica de una RP dada y es definida como la combinación de RP y las propiedades del suelo que determinan su velocidad de disolución (Rajan *et al.*, 1996). El uso de MSP y HM se ha propuesto como un mecanismo de bajo costo y bajo consumo de energía para ayudar a incrementar la efectividad agronómica de la RP (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Richardson, 2001). Los MSP solubilizan fosfatos insolubles, aumentando el P disponible en la solución del suelo (Selvakumar *et al.*, 2013; Oberson *et al.*, 2001). Por otro lado, la simbiosis micorrizal es reconocida por su capacidad de incrementar la captación de nutrientes, principalmente de P (Tinker *et al.*, 1992). La captación de P del suelo por los HM y la subsiguiente translocación y transferencia a la planta huésped permite tener un mayor crecimiento y concentración foliar de P (Osorio, 2011).

En este trabajo fue claro que la adición de RPNA sola fue eficaz para mejorar la absorción de P y el crecimiento de las plantas micorrizadas de maíz y frijol con respecto al control sin RP; esto no ocurrió con la RPA. Así mismo, la inoculación con *A. niger* por sí sola incrementó el crecimiento (MSA) y la absorción de P de las plantas de maíz y frijol. Sin embargo, se detectó una interacción significativa entre la adición de RP y la inoculación con *A. niger* (RPxAs) en frijol, pero no en maíz. Así en frijol, el efecto fue significativo si se utilizó la RPNA con *A. niger* y no con la RPA. Esto puede ser debido a la diferencia en la liberación de P por parte de las RP evaluadas. La RPA posee una fracción de P asimilable y de liberación inmediata lo que conlleva a su rápida fijación. En cambio, la RPNA tiene una liberación controlada de P, lo que reduce la precipitación y/o lixiviación de este elemento.

En el presente trabajo la eficacia de *Azospirillum* sp. no fue detectada en ninguna de las variables de medición, pero su presencia sí fue confirmada en las raíces (rizoplasma) de ambas especies vegetales. Esto puede estar relacionado con la fertilización (Solución

nutritiva Hoagland -libre de P-) ya que se ha reportado que altas concentraciones de N inhiben la actividad de la nitrogenasa (Shresta y Maskey, 2005; Rao, 1976). Según los reportes realizados por Shresta y Maskey (2005) señalan que la fertilización entre 20 a 100 kg de N ha<sup>-1</sup> reduce la fijación de N entre un 75 a 85%, mientras que Martensson *et al.* (2009) y Rao (1976) indicaron que la aplicación de bajos niveles de N (40 kg N ha<sup>-1</sup>), mejora la actividad de la enzima nitrogenasa.

En cuanto a la interacción de *Azospirillum* sp con HM, Saini *et al.* (2004), Vásquez *et al.* (2000) y Toro *et al.* (1996), reportaron que dicha interacción afecta positivamente el desarrollo de las especies vegetales. Esto indica la posibilidad de que haya compatibilidad funcional entre estos dos tipos de microorganismos (Azcón *et al.*, 1991). La hifa micorrizal libera compuestos carbonáceos a su alrededor y *Azospirillum* sp. utiliza estos compuestos como fuente de carbono y en contraparte proporciona NH<sub>3</sub> a las plantas (Saharan y Nehra, 2011). Además, *Azospirillum* sp. puede colonizar la superficie de la raíz e inducir cambios morfológicos que le den a las plantas un mejor acceso a los nutrientes (Okon y Kapulnik, 1986) o promover el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Osorio (2010) sugiere que en presencia de simbiosis micorrizal se favorece el establecimiento de interacciones con otros microorganismos benéficos y se incrementan los beneficios que estos brindan.

Vale la pena mencionar que, en el presente trabajo, no se observaron resultados significativos cuando se co-inoculo *Azospirillum* sp. y *A. niger*. En contraste, Valverde *et al.* (2006) y Sahin *et al.* (2004) encontraron que la inoculación combinada de MSP y BFN fue más efectiva que la inoculación individual en la promoción del crecimiento vegetal y en proporcionar una nutrición más equilibrada para los distintos cultivos.

En el caso del maíz micorrizado se encontró una reducción de la presencia de *Azospirillum* sp. en raíces cuando *A. niger* fue inoculado; esto, posiblemente, a competencia por fuentes de energía. Por lo tanto, los efectos de la inoculación con MSP y BFN deberían ser siempre corroborados bajo diferentes condiciones ambientales con el fin de establecer las condiciones adecuadas para el favorecimiento de la interacción.

La eficacia de los microorganismos del suelo, como modificadores de la fertilidad del suelo y facilitadores del establecimiento de las plantas, clásicamente, ha sido comprobada por medición de los cambios en el estado nutricional y el desarrollo de la planta (Semmartin *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2010).

Entender las funciones e interacciones de dichos microorganismos es relevante para establecer un manejo biotecnológico de los nutrientes del suelo, y de esta forma incrementar la productividad vegetal y cuidar el ambiente. Futuras investigaciones deberían centrarse en la interacción funcional entre *A. niger* y *R. fasciculatus*, para mejorar la disponibilidad de fósforo, y facilitar la absorción de éstos por las plantas. Además del empleo de fuentes fosfóricas de lenta liberación, ya que de esta manera se reducirían los riesgos ambientales provocados a causa de la excesiva fertilización.

Por otro lado, se podría evaluar la fertilización nitrogenada (fuentes, dosis) sobre los efectos en el crecimiento y la nutrición en plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. En el caso de las leguminosas (frijol), evaluar la compatibilidad funcional *A. niger*, *R. fasciculatus* y *Rhizobium*.

### 3.6 Bibliografía

- [1] ALAM S., KHALIL S., AYUB N., RASHID M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agriculture and Biology. 2002; 04(4):454-458.
- [2] AZCÓN R., RUBIO R., BAREA J.M. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N<sub>2</sub>-fixation (N15) and nutrition of *Medicago sativa* L. New Phytol. 1991; 117: 399–404.
- [3] BA A. M., GUISSOU T. Rock phosphate and vesicular–arbuscular mycorrhiza effects on growth and nutrient uptake of *Faidherbia albida* (Del.) seedlings in an alkaline sandy soil. Agroforestry Systems 1996; 34: 129–137.
- [4] BARROSO CB, PEREIRA GT, NAHAS E. Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon a nitrogen source. Braz J Microbiol. 2006. 37:434–438
- [5] BELIMOV A.A., SEREBRENNIKOVA N.V., STEPANOK V.V. Interaction of associative bacteria and an endomycorrhizal fungus with barley upon dual inoculation. Microbiology, 1999; 68: 104–108.
- [6] BOJINOVA D., VELKOVA R., IVANOVA R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 2008; 99:7348–7353.
- [7] BRUNDRETT M., BOUGHER N., DELL B., GROVE T., MALAJCZUK N. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32 Camberra. 1996.
- [8] BURDMAN S., VOLPIN H.; KAPULNIK Y., OKON Y. Promotion of nod gene inducers

and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) root inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. Applied Environmental Microbiology. 1996; 62:3030-3033

[9] COCHRAN W.G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. Biometrics. 1950; 6:105-116.

[10] DOBBELAERE S., VANDERLEYDEN, OKON Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci., 2003;22: 107-149

[11] DOBEREINER J., DAY J. M. Asociative simbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceeding of the first International Symposium on Nitrogen Fixation (W.E. Newton and C. J. Nyman. Edts.). Washington State University Press, Pullman. 1979. Pp 518-538.

[12] DOYLE M., BEUCHAT L., MONTVILLE T. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. España, 2001. Acribia.

[13] ELKOCA E., TURAN M., DONMEZ M. F. Effects of single, dual and triple inoculation with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoil on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. CV. 'ELKOCA-05'). J Plant Nut. 2010; 33:2104-2119.

[14] FAO. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal No. 13 Roma; 2007.

[15] FENALCE. Importancia de los cultivos representados por FENALCE. El cerealista. Mayo – Junio 2010.

[16] FOX R. L., KAMPRATH E. Phosphate sorption isotherms for evaluating phosphorus requirements of soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 1970; 34:902-907.

[17] GARZA G. D., V. J. CORTÉS, R. GARZA G. Evaluación de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con aplicación de (*Azospirillum* y Micorriza arbuscular) en la Huasteca hidalguense. 2001.

[18] GIOVANNETTI M., MOSSE B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-vesicular mycorrhizal infection of roots. New Phytologist. 1980; 84:489-500.

[19] GYANESHWAR P., KUMAR G. N., PAREKH L. J.; POOLE P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil. 2002; 245:83-93.

[20] HABTE M., FOX R., HUANG R. Determining vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of subleaflets of an indicator plant. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 1987; 18:1403-1420.

[21] HABTE M., OSORIO N.W. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying

arbuscular mycorrhizal inoculum. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu. 2001. 47 p.

[22] HALLMAN J., BERG G., SCHULZ B. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In: Microbial root endophytes. Edited by B. Shulz, C. Boyle, and T. Sieber. Springer-Verlag, Berlin. 2006. pp. 299–319.

[23] HEROUART D, BAUDOUIN E, FREND P, HARRISON J, SANTOS R, JAMET A, VAN DE SYPE G, TOUATI D, PUPPO A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–Rhizobium symbiosis? Plant Physiology and Biochemistry. 2002;40: 619–624.

[24] IRIZAR G. B. M., P. VARGAS V., D. GARZA G., C. TUT C., S. ROJAS M., A. TRUJILLO C. *et al.* Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la Región Central de México. Revista. Agricultura técnica de México. 2002; 29(2) Jul-diciembre.

[25] ITZIGSOHN R., ABBASS Z., SARIG S., OKON Y. Inoculation effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. NATO ASI Ser. Ser. G. 1995;37: 503-513.

[26] JAIN R, SAXENA J, SHARMA V. Solubilization of inorganic phosphates by *Aspergillus awamori* S19 isolated from agricultural soil of semi-arid region. Annals Microbiol. 2012; 62: 725-735.

[27] JOHANSSON J.F., PAUL L.R., FINLAY R.D. "Minireview. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture." FEMS Microbiology Ecology. 2004; 48: 1-13.

[28] KHAN M. S., ZAIDI A., WANI P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. Agron. Sustain. Dev. 2007;27:29–43

[29] KIM K. Y., JORDAN D., MCDONALD. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biology and Fertility of Soils. 1998; 26:79-87.

[30] KUCEY R. M. N., JANZEN H. H., LEGETT M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in Agronomy. 1989; 42:198-228.

[31] LANGE R. L., VLECK P. L. G. Mechanism of calcium and phosphate release from hydroxy-apatite by mycorrhizal hyphae. Soil Sci. Soc. Am. J. 2000; 64: 949-955

[32] LODWIG E, POOLE P. Metabolism of rhizobium bacteroids. Crit. Rev. Plant Sci. 2003; 22, 37–78.

[33] LONDOÑO AA. Efecto de la inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de fósforo en la absorción de fosfato y crecimiento de *Leucaena*

leucocephala en un oxisol [tesis de maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

[34] MANJUNATH A., HUE N. V., HABTE M. Response of *Leucaena leucocephala* to vesicular–arbuscular mucorrhizal colonization and rock phosphate fertilization in an oxisol. Plant Soil. 1989; 114:127-133

[35] MARTENSSON L, DIEZ B, WARTIAINEN I, ZHENG W, EL-SHEHAWY R, RASMUSSEN U. Diazotrophic diversity, nifH gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. Plant and Soil. 2009; 325: 207-218.

[36] MURPHY J., RILEY J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta. 1962; 27:31-35.

[37] OBERSON A., FRIESEN D.K., RAO I.M., BÜHLER S., FROSSARD E. Phosphorus transformations in an Oxisol under contrasting land-use systems: the role of the soil microbial biomass. Plant Soil. 2001; 237:197–210.

[38] OKE V, LONG SR. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. Curr Opin Microbiol. 1999; 2: 641-646

[39] OKON Y., LABANDERA-GONZÁLEZ C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 1994; 26: 1591-1601.

[40] OKON Y., KAPULNIK Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. Plant and Soil 1986; 90:3-16.

[41] OLALEYE O., F. OLAJIRE, R. C. ABAIDOO, I. NNENNA. Phosphorus response efficiency in cowpea genotypes. J. Agric. Sci. 2012; 4: 81-90.

[42] OLIVEIRA C.A, ALVES V.M.C, MARRIEL I.E, GOMES E.A, SCOTTI M.R, CARNEIRO N.P, GUIMARAES C.T, SCHAFFERT RE, SA´ NMH. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biol Biochem. 2009; 41(9): 1782–1787

[43] OSORIO N.W. Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos del trópico Colombia, Suelos Ecuatoriales ISSN: 0562-5351, 2011; 14 (1): 74 - 91

[44] OSORIO N. W., HABTE M. Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. Botany. 2013;91(4):274-281

[45] OSORIO NW, HABTE M. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus

and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res Mgmt.* 2001; 15:263-274.

[46] OSORIO N. W., HABTE M. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and grow of plants in the soils of the tropics. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement.* 2009: 325-351.

[47] OSORIO N.W. Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms 392 p. 2008.

[48] OSORIO N.W. Manejo de nutrientes en suelos del trópico. Segunda edición ISBN:978-958-44-9746-8. 2014, 416 p.

[49] PACOVSKY R.S. Diazotroph establishment and maintenance in the Sorghum-*Glomus-Azospirillum* association. *Can. J. Microbiol.* 1989; 35: 977–981.

[50] PAIVA-COUTINHO F., WAGNER-PEREIRA F., MAYUMI A., YANO-MELO. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecol Eng.* 2012;42:85-89.

[51] PHILLIPS J. M., HAYMAN D. S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society.* 1970; 55:158-161.

[52] PICCINI D; AZCON R. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayovar rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium. *Plant and Soil.* 1987; 101: 45-50.

[53] PORTER W. M. The most probable number method for enumerating propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Austr. J. Soil Res.* 1979; 17:515-519.

[54] QIN C. Q., WU X. H., ZHENG K., QIN P. Effects of phosphate-solubilizing fungi on costal saline soil available phosphorous content and salt-tolerant oil plant growth. *Chinese Journal of Ecology* 2009; 28(09) 1835-1841.

[55] RAJAN S. S., WATKINSON J. H., SINCLAIR A. G. Phosphate rocks for direct application to soils. *Adv. Agron.* 1996; 57:77–159.

[56] RAO, V.R. Nitrogen fixation as influenced by moisture content, ammonium sulphate and organic sources in a paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 1976; 8, 445-448.

[57] RICHARDSON A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* 2001; 28: 897–906

[58] SAHARAN B. S., NEHRA V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011; 21: 1-30.

- [59] SAHIN F., CAKMAKCI R., KANTAR F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub> -fixing and phosphate solubilizing bacteria. PLANT SOIL 2004; 265: 123-129.
- [60] SAINI V. K., BHANDARE S. C., TARAFDAR J. C. Comparison of crop yield, soil microbial C, N, and P, N-fixation, nodulation and mycorrhizal infection in inoculated and non-inoculated sorghum and chickpea crops. Field Crop Res 2004;89:39–47
- [61] SALE P. W. G., MOKWUNYE A. U. Use of phosphate rocks in the tropics. Fert Res. 1993; 35: 33-45.
- [62] SELVAKUMAR G; JOSHI P; SUYAL P; KUMAR MISHRA P; KRISHNA JOSHI G; VENUGOPALAN R; KUMAR BISHT J; CHANDRA BHATT J; SHANKAR GUPTA H. Rock phosphate solubilization by psychrotolerant *Pseudomonas* spp. and their effect on lentil growth and nutrient uptake under polyhouse conditions Annals of Microbiol 2013. DOI 10.1007/s13213-012-0594-5.
- [63] SEMMARTIN M, DI BELLA C, GARCÍA DE SALAMONE IE. Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms. Plant and Soil. 2010; 328:471-481.
- [64] SHRESTHA R.K., MASKEY S.L. Associative nitrogen fixation in lowland rice. Nepal Agriculture Research Journal. 2005; 6, 112-121
- [65] SINGH H., REDDY M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. Eur J Soil Biol. 2011; 47:30-34.
- [66] SOMERS E., VANDERLEYDEN J., SRINIVASAN M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet, Crit. Rev. Microbiol.2004; 30:205-240.
- [67] TAKÁCS T., BIRÓ I., ANTON A., CHAOXING H. Inter- and intraspecific variability in infectivity and effectiveness of five *Glomus* sp. strains and growth response of tomato host. (In Hungarian) Agrokémia és Talajtan. 2006; 55(1): 251-260.
- [68] TALLAPRAGADA P., SESHACHALA U. Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of *Piper betel* in Karnataka, India. Turk J Biol. 2012; 36: 25- 35.
- [69] THOMSON B, OSTLE N, MCNMARA N, BAILEY M, WHITELEY A, GRIFFITHS R. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. Microbial Ecology. 2010; 59:335-343
- [70] TIEN T. M., GASKIN M. H., HUBBEL D. H. Plant growth substances produced by *A.*



*brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol., 1979; 37: 1016-1024.

[71] TINKER P. B., JONES M. D., DURALL D. M. A functional comparison of ecto- and endomycorrhizas. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, and Alexander IJ [eds.], Mycorrhizas in ecosystems, 303–310. CAB International, Wallingford, UK. 1992.

[72] TORO M., AZCON R., BAREA J. M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing Rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. Applied and Environmental Microbiology. 1997;63(11): 4408–4412.

[73] TORO M., NEDIALKOVA K., AZCON R., BAREA J. M. Establishment of two rock phosphate- solubilizing bacteria in the rhizosphere of mycorrhizal onion plants and their effect on plant growth in a microcosm. In Mycorrhizas in Integrated Systems from Genes to Plant Development. Eds. C Azcon-Aguilar and J M Barea. pp 665–668. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development, Brussels, Belgium. 1996.

[74] UCHIDA R, HUE NV. Soil acidity and liming. In Plant nutrient management in Hawaiian soils, approaches for tropical and subtropical agriculture. Edited by J.A. Silva, and R. Uchida. University of Hawaii, Honolulu. 2000. pp.101–111.

[75] VALVERDE A., BURGOS A., FISCELLA T., RIVAS R., VELASQUEZ E., RODRIGUEZ-BARRUECO C., CERVANTES E., CHAMBER M., ELGUAL J. M. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizo biumciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Plant and Soil. 2006; 287: 25-34.

[76] VASQUEZ M. M., CESAR S., AZCON R., BAREA J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Appl. Soil Ecol. 2000; 15: 261-272.

[77] VASSILEV N., FENICE M., FEDERICI F. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. Biotechnology Techniques. 1996; 10, 585-588.

[78] VASSILEVA M, AZCON R, BAREA J. M, VASSILEV N. Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. Journal of Biotechnology. 1998; 63: 67–72

[79] WHITELOW M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing

fungi. Adv Agron. 2000; 69:99-151.

## A. Anexo: Valores de cada una de las variables respuesta para cada uno de los tratamientos – Disolución *in vitro* de RP por MSP

Inóculo	RP	Tratamiento	pH			P soluble			Masa seca microbial		
As	Santander	T1R2	3,6	3,6	3,5	95	99	103	0,0385	0,0342	0,0299
As	Boyacá	T1R3	3,6	3,6	3,6	79	88	97	0,0392	0,0379	0,0366
AsPn	Santander	T2R2	3,8	3,7	3,7	48	61	73	0,0413	0,0359	0,0306
AsPn	Boyacá	T2R3	3,7	3,7	3,6	41	42	43	0,0415	0,0412	0,0408
AsB	Santander	T3R2	3,7	3,6	3,6	78	74	70	0,0341	0,0287	0,0233
AsB	Boyacá	T3R3	3,7	3,7	3,7	87	72	56	0,0348	0,0313	0,0278
AsAt	Santander	T4R2	3,7	3,6	3,5	79	93	106	0,0325	0,0298	0,0272
AsAt	Boyacá	T4R3	3,7	3,7	3,7	65	61	56	0,0387	0,0328	0,0269
AsPnB	Santander	T5R2	3,5	3,7	3,8	100	69	37	0,0369	0,0297	0,0225
AsPnB	Boyacá	T5R3	3,8	3,7	3,6	38	36	34	0,0515	0,0458	0,0402
AsPnAt	Santander	T6R2	3,8	3,8	3,8	52	46	40	0,0364	0,0305	0,0247
AsPnAt	Boyacá	T6R3	3,8	3,7	3,7	40	33	26	0,0379	0,0357	0,0335
AsBAAt	Santander	T7R2	3,7	3,6	3,6	78	76	74	0,0270	0,0242	0,0214
AsBAAt	Boyacá	T7R3	3,7	3,8	3,8	63	52	40	0,0301	0,0264	0,0226
AsPnBAAt	Santander	T8R2	3,7	3,8	3,8	48	55	61	0,0386	0,0314	0,0242
AsPnBAAt	Boyacá	T8R3	3,7	3,6	3,6	64	55	46	0,0505	0,0456	0,0407
Pn	Santander	T9R2	4,1	4,0	3,7	27	22	33	0,0179	0,0188	0,0197
Pn	Boyacá	T9R3	3,9	3,9	3,9	10	18	14	0,0228	0,0232	0,0234
B	Santander	T10R2	4,3	4,2	5,0	3	4	1	0,0097	0,0089	0,0085
B	Boyacá	T10R3	5,1	4,5	4,0	23	23	23	0,0084	0,0089	0,0097
PnB	Santander	T11R2	4,1	3,6	4,1	4	5	6	0,0190	0,0263	0,0235
PnB	Boyacá	T11R3	4,0	3,8	3,9	20	23	16	0,0269	0,0277	0,0285
PnAt	Santander	T12R2	3,6	4,0	4,1	7	10	12	0,0207	0,0234	0,0260
PnAt	Boyacá	T12R3	4,0	3,9	3,9	24	27	22	0,0220	0,0287	0,0254
PnBAAt	Santander	T13R2	4,1	4,0	4,0	20	16	23	0,0164	0,0253	0,0202
PnBAAt	Boyacá	T13R3	4,0	4,0	3,7	10	17	15	0,0195	0,0251	0,0247
BAAt	Santander	T14R2	4,2	4,1	4,1	19	13	11	0,0088	0,0153	0,0160
BAAt	Boyacá	T14R3	4,1	3,9	4,0	10	9	6	0,0160	0,0151	0,0157
At	Santander	T15R2	4,3	4,2	4,1	9	11	7	0,0111	0,0135	0,0158
At	Boyacá	T15R3	4,1	3,7	4,0	7	5	6	0,0159	0,0073	0,0244
Control	Santander	T16R2	5,6	4,8	5,1	20	17	18	0,0065	0,0049	0,0062
Control	Boyacá	T16R3	5,3	4,4	5,4	15	13	19	0,0096	0,0071	0,0072



**B. Anexo: Valores de cada una de las variables respuesta para cada uno de los tratamientos – Efecto de la inoculación con un HSP y una BFN sobre el desarrollo de plántulas maíz y fríjol micorrizadas**

RESULTADOS MAIZ																						
Azo	As	RP	Altura (cm)					Masa seca aérea (g)					Presencia <i>Azospirillum</i> (%)					Presencia <i>A. niger</i> (%)				
1	1	A	31	21	31	32	19	7,10	2,48	4,78	5,38	3,33	70	0	50	100	90	30	40	90	60	40
1	1	NA	52	51	29	27	22	15,39	22,75	5,19	5,26	6,22	60	40	50	90	70	10	20	0	10	0
1	1	SIN	27	25	30	28	23	2,18	4,52	6,91	5,48	2,73	100	90	50	60	50	40	30	60	20	10
1	0	A	24	40	30	27	25	1,97	6,95	6,30	3,34	1,77	100	50	70	90	60	20	20	10	10	10
1	0	NA	28	30	33	25	36	4,39	5,43	6,23	4,06	6,06	90	100	100	80	70	10	10	30	0	10
1	0	SIN	18	20	25	20	25	2,35	2,69	4,82	4,63	3,60	80	80	90	60	100	30	40	0	0	30
0	1	A	33	23	32	19	29	6,90	1,56	7,59	3,94	7,06	0	10	30	30	50	30	30	20	30	30
0	1	NA	57	54	18	31	17	19,06	18,14	1,28	6,11	2,66	60	10	0	40	30	30	20	50	70	30
0	1	SIN	23	27	30	29	28	5,29	4,19	6,00	3,66	5,21	20	90	70	50	30	40	50	30	30	30
0	0	A	26	33	21	20	21	3,68	4,81	2,99	3,10	3,56	70	80	50	70	70	0	30	0	50	0
0	0	NA	26	31	23	30	25	5,64	5,20	3,00	3,98	2,67	50	40	40	70	50	0	0	30	20	20
0	0	SIN	23	15		27	29	2,65	1,30		3,28	4,52	30	40		20	20	0	0		0	0

## Continuación Anexo B

RESULTADOS MAIZ																			
Presencia <i>R. fasciculatus</i> (%)					Contenido P foliar 10					Contenido P foliar 25					Contenido P foliar 40				
27,3	17,1	8,16	23,3	5	1,20	1,20	2,10	1,10	1,30	0,50	0,60	0,60	0,50	0,50	1,20	0,89	0,35	0,33	0,64
17,1	17,7	24,5	31	23,3	1,20	2,60	0,90	1,00	1,20	1,20	1,40	0,60	0,60	0,80	1,15	1,37	1,02	0,67	0,97
19,4	22,5	18,2	18,6	19,8	1,00	1,10	1,00	1,40	1,20	0,60	0,50	0,80	0,80	0,80	0,29	1,08	1,02	1,34	0,70
22,5	21,2	21,5	18,4	25	1,20	1,50	1,10	1,20	1,40	0,80	0,60	0,30	0,30	0,80	0,88	0,81	1,40	0,56	0,72
5,13	18,2	20	5,94	32,8	1,30	1,30	1,10	1,30	1,40	0,60	0,40	0,70	0,40	0,60	0,54	0,94	1,16	1,19	0,59
13,6	22,1	22	14,3	27,3	3,80	1,60	0,70	1,40	1,10	1,50	0,50	0,60	0,50	0,50	0,65	0,73	1,20	1,11	0,61
16,7	12,5	7,61	20	11,8	1,00	1,20	1,40	1,10	1,00	0,90	0,30	0,40	0,90	0,80	0,97	1,00	1,10	0,96	1,05
17,2	10,5	30	15	25	3,20	2,50	1,00	1,20	1,30	1,70	1,70	0,40	0,40	0,50	1,00	1,27	0,62	0,58	0,59
20,8	18	14,3	10,3	35	1,00	1,30	1,50	1,20	1,00	0,40	0,90	0,50	0,90	0,60	0,48	0,64	0,73	0,56	0,78
5	37	25,5	20,5	18,5	1,10	1,20	1,40	1,10	0,80	0,60	0,50	0,40	0,60	0,50	1,10	1,43	0,89	0,75	0,62
15	5,13	12,5	7,32	13,7	1,60	1,00	1,60	1,40	1,30	0,60	0,60	0,40	0,60	0,90	0,96	0,48	0,48	0,49	0,35
13,6	22,2		20	16	1,10	1,10	1,20	1,50	1,40	0,40	0,50	0,70	0,70	0,60	0,46	0,43	4,67	0,40	0,37

RESULTADOS MAIZ																			
Contenido P foliar 55					Concentración P foliar 10					Concentración P foliar 25					Concentración P foliar 40				
0,80	0,90	1,40	0,60	1,10	0,20	0,20	0,35	0,18	0,22	0,17	0,20	0,12	0,10	0,10	0,17	0,15	0,06	0,06	0,16
1,70	1,50	1,40	1,10	1,40	0,20	0,43	0,15	0,17	0,20	0,40	0,20	0,12	0,20	0,16	0,38	0,17	0,17	0,17	0,16
0,80	0,70	1,00	0,90	0,60	0,17	0,18	0,17	0,23	0,20	0,12	0,10	0,27	0,27	0,16	0,06	0,18	0,25	0,19	0,23
1,20	0,90	0,90	0,90	1,00	0,20	0,25	0,18	0,20	0,23	0,20	0,15	0,06	0,08	0,16	0,15	0,12	0,20	0,14	0,12
0,90	0,80	1,00	1,70	1,40	0,22	0,22	0,18	0,22	0,23	0,15	0,10	0,18	0,10	0,15	0,18	0,24	0,23	0,15	0,15
0,70	0,70	1,50	1,50	0,90	0,63	0,27	0,12	0,23	0,18	0,25	0,17	0,12	0,13	0,13	0,13	0,24	0,17	0,12	0,10
1,60	0,80	1,20	1,60	1,00	0,17	0,20	0,23	0,18	0,17	0,18	0,06	0,07	0,18	0,13	0,24	0,20	0,22	0,16	0,13
1,10	1,90	1,40	1,10	1,10	0,53	0,50	0,17	0,17	0,26	0,57	0,57	0,13	0,13	0,17	0,13	0,32	0,12	0,19	0,08
1,20	1,10	0,90	1,00	1,00	0,17	0,22	0,21	0,20	0,14	0,08	0,15	0,10	0,18	0,09	0,16	0,16	0,18	0,14	0,13
1,10	1,30	1,00	1,10	1,20	0,18	0,20	0,23	0,18	0,13	0,20	0,13	0,13	0,20	0,13	0,14	0,29	0,11	0,11	0,12
1,40	1,30	0,90	1,20	0,80	0,27	0,14	0,23	0,18	0,22	0,15	0,15	0,08	0,12	0,15	0,16	0,16	0,12	0,07	0,09
0,80	0,80	1,90	1,00	0,80	0,18	0,18	0,20	0,25	0,23	0,07	0,10	0,14	0,18	0,10	0,12	0,11	0,67	0,07	0,07

## Continuación Anexo B

RESULTADOS MAIZ									
Concentración P foliar 55					CPAF (mg)				
0,10	0,11	0,16	0,08	0,12	7,1	2,8	7,4	4,0	4,1
0,15	0,14	0,16	0,09	0,14	23,8	31,0	8,1	4,8	8,7
0,07	0,08	0,11	0,13	0,10	1,5	3,5	7,7	7,0	2,7
0,11	0,09	0,10	0,11	0,10	2,1	6,3	6,3	3,8	1,8
0,10	0,09	0,10	0,15	0,12	4,4	4,8	6,2	6,3	7,1
0,07	0,07	0,14	0,13	0,09	1,6	1,9	6,6	5,8	3,2
0,15	0,07	0,10	0,16	0,10	10,0	1,1	7,6	6,3	7,1
0,09	0,16	0,14	0,12	0,11	17,5	28,7	1,8	7,5	2,9
0,12	0,11	0,10	0,11	0,11	6,3	4,6	6,0	4,1	5,8
0,10	0,13	0,10	0,11	0,12	3,7	6,3	3,0	3,4	4,3
0,14	0,13	0,10	0,12	0,10	7,9	6,8	3,0	4,8	2,7
0,09	0,08	0,14	0,11	0,09	2,4	1,0	0,0	3,6	4,0

RESULTADOS FRIJOL																						
Azo	As	RP	Altura (cm)					Masa seca aérea (g)					Presencia <i>Azospirillum</i> (%)					Presencia <i>A. niger</i> (%)				
1	1	A	22	23	39	30	16	1,89	2,64	2,47	2,89	2,43	65	40	65	80	70	15	40	10	5	15
1	1	NA	41	65	23	25	25	4,54	5,78	1,50	2,20	1,93	90	60	65	0	50	20	0	30	5	40
1	1	SIN	25	24	25	16	28	2,78	1,86	2,51	2,09	2,53	10	85	55	10	25	20	15	20	30	10
1	0	A	33	28	23	23	26	1,62	2,89	2,47	2,18	1,94	70	50	55	85	30	20	10	0	10	10
1	0	NA	23	27	21	37	20	2,42	1,28	1,15	2,68	1,49	50	60	45	20	70	5	0	10	0	15
1	0	SIN	21	18	23	20	23	1,43	1,47	1,94	1,26	1,07	100	70	15	10	75	15	20	5	15	0
0	1	A	30	25	32	30	25	2,73	2,01	2,29	2,53	1,55	0	30	50	5	5	0	40	0	15	10
0	1	NA	47	46	46	23	29	4,14	3,23	3,80	2,86	3,18	25	0	0	5	15	15	25	25	10	30
0	1	SIN	22	23	15	29	27	1,06	1,90	2,46	2,29	1,40	10	0	15	25	20	20	25	10	10	10
0	0	A	26	21	24	22	21	1,66	2,23	2,29	1,92	2,66	20	0	30	40	5	5	5	0	25	0
0	0	NA	34	22	20	25	26	2,84	2,04	1,33	2,60	1,73	0	5	5	0	5	5	10	0	20	15
0	0	SIN	32	25	18	24	35	1,54	1,79	0,86	2,46	1,42	10	10	0	0	0	35	5	5	20	0

## Continuación Anexo B

RESULTADOS FRIJOL																			
Presencia <i>R. fasciculatus</i> (%)					Contenido P foliar 10					Contenido P foliar 25					Contenido P foliar 40				
18	23,1	4,17	17,3	18,4	2,20	1,60	1,50	1,40	2,30	1,20	1,20	1,10	1,10	1,10	2,30	2,19	2,47	1,61	2,36
12,5	16,1	12,5	8	13,5	2,10	1,60	1,60	1,60	1,50	1,70	1,30	1,60	1,00	1,10	2,08	4,78	2,33	3,01	2,08
4,17	10	6	15,6	20	1,30	1,60	1,70	2,00	1,80	1,30	1,10	1,10	1,10	1,10	2,06	2,03	3,59	1,72	2,93
16	9,5	4,25	13,7	14,6	2,50	1,70	1,50	1,80	2,50	1,30	1,50	1,10	1,30	1,40	1,86	1,90	2,00	2,71	3,34
11,5	19,9	17,6	16	34,3	1,90	2,60	1,90	1,70	1,70	1,10	1,30	1,30	1,40	1,20	4,39	1,72	1,93	2,75	1,94
15,7	14,3	4,08	9,25	13	2,00	1,70	2,00	1,80	2,40	1,50	1,30	1,20	1,20	1,20	1,37	1,86	2,42	2,55	1,88
11	14	3,92	2,13	24	1,90	1,90	1,30	1,80	1,40	1,30	1,60	1,60	1,30	1,10	2,33	3,49	1,15	3,23	2,18
12	20,8	23,1	25,5	8	1,90	1,40	1,70	2,10	1,40	1,00	0,80	1,30	1,50	1,10	4,14	2,93	2,44	2,63	2,45
6	18	12,8	11,7	10	1,20	1,60	2,30	1,60	1,30	1,50	1,10	1,30	1,10	1,00	2,90	2,07	3,22	3,01	1,58
10,3	8,7	10,4	10,2	11,9	1,70	1,40	1,20	1,40	1,80	1,00	1,20	1,50	1,20	1,40	1,38	1,98	2,36	1,93	2,45
9,8	16	1,96	8	2,08	1,50	1,40	1,50	1,50	1,20	1,30	1,10	1,00	1,20	1,00	1,83	2,25	1,98	1,34	2,34
14,3	8,33	14,6	17,1	15,4	2,00	1,40	1,50	2,50	1,20	1,10	1,00	1,50	1,10	1,10	1,35	1,57	1,51	3,10	2,23

RESULTADOS FRIJOL																			
Contenido P foliar 55					Concentración P foliar 10					Concentración P foliar 25					Concentración P foliar 40				
2,00	2,50	2,70	3,40	3,20	0,20	0,15	0,13	0,14	0,23	0,13	0,12	0,12	0,14	0,12	0,21	0,17	0,19	0,12	0,24
5,20	3,70	2,30	3,00	2,30	0,21	0,16	0,16	0,16	0,15	0,21	0,16	0,20	0,11	0,14	0,21	0,60	0,17	0,27	0,21
0,90	1,30	2,10	2,70	2,30	0,12	0,15	0,15	0,18	0,16	0,13	0,11	0,11	0,11	0,11	0,19	0,17	0,36	0,16	0,24
2,70	2,40	2,70	2,40	2,10	0,28	0,19	0,17	0,20	0,28	0,13	0,17	0,12	0,13	0,16	0,17	0,16	0,20	0,25	0,33
3,60	3,20	2,10	2,90	2,90	0,19	0,24	0,19	0,15	0,15	0,10	0,13	0,13	0,14	0,12	0,37	0,16	0,15	0,25	0,15
2,90	2,70	2,60	2,70	2,70	0,20	0,17	0,20	0,18	0,24	0,14	0,11	0,11	0,12	0,12	0,11	0,17	0,19	0,23	0,13
3,00	1,60	1,80	2,50	2,50	0,21	0,21	0,13	0,20	0,14	0,16	0,20	0,20	0,16	0,14	0,21	0,35	0,10	0,32	0,22
3,80	2,90	2,40	2,00	2,70	0,21	0,18	0,14	0,21	0,12	0,10	0,13	0,16	0,15	0,12	0,38	0,24	0,19	0,26	0,22
2,90	2,50	2,40	1,50	2,70	0,12	0,16	0,23	0,16	0,13	0,14	0,10	0,11	0,12	0,10	0,32	0,17	0,32	0,27	0,11
1,60	2,40	1,70	2,70	2,80	0,17	0,13	0,13	0,13	0,18	0,10	0,12	0,14	0,12	0,14	0,11	0,18	0,21	0,15	0,31
2,50	2,50	2,40	2,60	2,40	0,14	0,16	0,17	0,17	0,13	0,11	0,10	0,08	0,12	0,10	0,15	0,20	0,15	0,13	0,18
2,70	2,60	2,50	2,20	2,50	0,25	0,18	0,19	0,31	0,15	0,14	0,17	0,21	0,14	0,16	0,10	0,12	0,14	0,28	0,17



## Continuación Anexo B

RESULTADOS FRIJOL									
Concentración P foliar 55					CPAF (mg)				
0,20	0,21	0,25	0,34	0,25	3,8	5,5	6,1	9,8	6,0
0,52	0,34	0,18	0,30	0,23	23,6	19,4	2,7	6,6	4,4
0,10	0,12	0,19	0,30	0,21	2,8	2,2	4,8	6,3	5,3
0,25	0,22	0,25	0,22	0,18	4,0	6,3	6,1	4,8	3,4
0,30	0,29	0,15	0,22	0,26	7,3	3,7	1,7	6,0	3,9
0,22	0,25	0,19	0,23	0,23	3,2	3,6	3,6	2,8	2,4
0,25	0,12	0,14	0,17	0,21	6,8	2,5	3,2	4,2	3,2
0,32	0,22	0,20	0,25	0,23	13,1	7,2	7,6	7,2	7,2
0,29	0,21	0,22	0,17	0,25	3,1	4,0	5,4	3,8	3,4
0,16	0,22	0,17	0,30	0,25	2,7	4,9	3,9	5,8	6,8
0,25	0,28	0,24	0,24	0,24	7,1	5,7	3,2	6,1	4,2
0,34	0,29	0,23	0,18	0,25	5,2	5,2	2,0	4,5	3,6



## C. Anexo: Fichas técnicas RP


1. RP comercializada por Fosfonorte, y acidulada por Mejisulfatos.

		
FICHA TÉCNICA		
DAPHOS		GRANULAR Reg. ICA 5929
Este producto está diseñado para suministrar Fósforo, Calcio, Magnesio, Azufre gradualmente y Silicio en forma de ácido monosilícico para reducir la fijación del Fósforo.		
COMPOSICIÓN QUÍMICA		%
Fósforo	(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	25
Calcio	(CaO)	35
Magnesio	(MgO)	7
Azufre	(S)	3
Silicio	(SiO <sub>2</sub> )	22

2. RP comercializada por Fosfatos de Boyacá y acidulada por Cales Río Claro.

<b>FÓSFORO SOLUBLE P-10 río claro</b>	
FÓSFORO ASIMILABLE ( $P_2O_5$ )	10.0 %
FÓSFORO TOTAL ( $P_2O_5$ )	20.0 %
CALCIO SOLUBLE EN ÁCIDO (CaO)	36.0 %
AZUFRE TOTAL (S)	5.0 %
SILICIO TOTAL ( $SiO_2$ )	8.0 %
REGISTRO DE VENTA ICA	<b>6189</b>
<p><b>FÓSFORO SOLUBLE P-10 RÍO CLARO</b> es un fertilizante que se obtiene de la acidulación de la roca fosfórica logrando un producto con el 10% de fósforo asimilable y el resto de fósforo parcialmente soluble de efecto residual y aportando además calcio, azufre, silicio y trazos de elementos menores.</p> <p><b>FÓSFORO SOLUBLE P-10 RÍO CLARO</b> reemplaza fertilizantes fosforados que se utilizan al momento de la siembra a un menor costo.</p>	

## 3. RP comercializada por Fosfonorte.

 <b>FOSFONORTE S.A.</b>	<b>MANUAL DE PROCESOS OPERATIVOS</b>	<b>MPO -04-F-03-1</b>	
	<b>CONTROL DE CALIDAD</b>	<b>FECHA</b> 12/02/10	<b>VERSIÓN</b> 1
	<b>ANÁLISIS DE MUESTRAS</b>	Página 1 de 1	

<b>CERTIFICADO DE LABORATORIO</b>
-----------------------------------

<b>CIUDAD</b>		<b>FECHA</b>		
Cúcuta		18 DE OCTUBRE DE 2014		
<b>TIPO DE CERTIFICADO DE LABORATORIO</b>			<b>CÓDIGO</b>	
Calidad			C-2014-727	
<b>PRODUCTO</b>		<b>CLIENTE / INTERESADO</b>		
INDUSTRIAL DEL 30%				
<b>REMISIÓN</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>FECHA DE ANÁLISIS</b>	<b>FECHA DE MUESTREO</b>	<b>LOTE</b>
		18/11/14	18/11/14	11
<b>ANÁLISIS</b>		<b>RESULTADO</b>	<b>ESPECIFICACIONES / MÉTODO</b>	
Fosforo Total= P2O5		29,06 %		
Calcio Total = CaO				
Humedad		3,16 %		